

**Genetische Grundlagen der Amelogenesis imperfecta –  
Mutationsfrequenzen und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae  
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Stefanie Baum, geb. Goebel  
geboren am 29.06.1979 in Saalfeld

Gutachter

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Tag der öffentlichen Verteidigung: \_\_\_\_\_

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
A. inject.	Aqua ad injectabilia
AI	Amelogenesis imperfecta
AMBN	Ameloblastin
AMELX	Amelogenin
AMTN	Amelotin
AS	Aminosäure
BMP	engl. Bone Morphogenic Protein
COL17A1	engl. Collagen, type XVII, alpha 1
C4orf26	engl. Chromosome 4 open reading frame 26
DI	Dentinogenesis imperfecta
DLX3	engl. Distal-less Homeobox 3
FGF	engl. Fibroblast Growth Factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENAM	Enamelin
FAM20A	engl. Family with sequence similarity 20, member A
FAM83H	engl. Family with sequence similarity 83, member H
JEB	junktionale Epidermolysis bullosa
KLK4	engl. Kallikrein-related Peptidase 4
LAMB3	Laminin- $\beta$ 3
MIH	Molaren-Inzisiven-Hypomineralisation
MMP20	Matrix Metalloproteinase 20
NSG	engl. next-generation sequencing
ODAM	engl. Odontogenic Ameloblast-associated Protein
OK	Oberkiefer
OMIM	engl. Online Mendelian Inheritance in Man
OPG	Orthopantomogramm
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. polymerase chain reaction
SDG	Schmelz-Dentin-Grenze
SLC4	engl. Solute carrier family 4
SNP	engl. single nucleotide polymorphism

## Abkürzungsverzeichnis

---

Sp6	engl. Specificity Protein 6
TDO	Tricho-dento-ossäres Syndrom
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UK	Unterkiefer
WDR72	engl. WD Repeat-containing Protein 72

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Die ungestörte Amelogenese	3
2.1.1	Strukturelemente des Zahnschmelzes	3
2.1.2	Phasen der Schmelzbildung und Ameloblastenfunktion	4
2.1.3	Schmelzmatrixproteine	8
2.2	Amelogenesis imperfecta (AI): Definition und Charakteristika	11
2.3	Klinik	12
2.3.1	Diagnostik	12
2.3.2	Differentialdiagnosen	13
2.4	Phänotypische Klassifikation der Amelogenesis imperfecta	13
2.4.1	Amelogenesis imperfecta Typ I-Hypoplastischer Typ (AI1)	15
2.4.2	Amelogenesis imperfecta Typ II-Hypomaturationsstyp (AI2)	16
2.4.3	Amelogenesis imperfecta Typ III-Hypokalzifikationsstyp (AI3)	17
2.4.4	Amelogenesis imperfecta Typ IV-hypoplastisch-Hypomaturationsstyp mit Taurodontismus (AI4)	17
2.5	Genetische Grundlagen der Amelogenesis imperfecta	18
2.5.1	Kandidatengene und verursachende Mutationen der Amelogenesis imperfecta	19
2.5.2	X-chromosomal vererbte Amelogenesis Imperfecta (XAI)	20
2.5.3	Autosomal-dominant vererbte Amelogenesis Imperfecta (ADAI)	21
2.5.4	Autosomal-rezessiv vererbte Amelogenesis Imperfecta (ARAI)	23
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>25</b>

<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
4.1	Material	26
4.1.1	Arbeitsgeräte und Materialien	26
4.1.2	Reagenzien	27
4.2	Methoden	29
4.2.1	Patienten und Studienrahmenbedingungen	29
4.2.2	Molekulargenetische Untersuchung zum Nachweis krankheitsverursachender Mutationen in den Zielsequenzen der Kandidatengene	30
4.2.2.1	Blutentnahme und DNA-Isolation	30
4.2.2.2	Polymeraese-Ketten-Reaktion	30
4.2.2.3	Gel-Elektrophorese	31
4.2.2.4	Sequenzierung	31
4.2.2.5	PCR-und Elektrophoresebedingungen	32
4.2.2.6	Aufreinigung der PCR-Produkte	37
4.2.2.7	Sequenzierungs-PCR	37
4.2.2.8	Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte	38
4.2.2.9	Auswertung der Sequenzierung	39
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
5.1	Molekulargenetische Untersuchung zum Nachweis krankheitsverursachender Mutationen in den Kandidatengenen	40
5.2	Morphologie, Anamnese, Stammbaumauswertung und molekulargenetische Untersuchung in 17 Familien mit klinischer Verdachtsdiagnose einer isolierten AI	50
5.2.1	Familien mit nachgewiesener Enamelin-Mutation	51
5.2.2	Familien mit nachgewiesener DLX3-Mutation	55
5.2.3	Familien ohne nachgewiesene pathogene Mutation in den Kandidatengenen	57
5.2.4	Familien mit nachgewiesener WDR72-Mutation	77

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
6.1	Auswirkungen der Enamelin-Mutation g.13185_13186insAG	82
6.1.1	Pathologisches Potential der Mutation	82
6.1.2	Phänotypische Vielfalt der Mutation	84
6.1.3	Die Mutation im compound-heterozygoten Zustand	86
6.2	Vergleich der Merkmalsausprägungen der Patienten mit der Enamelin-Mutation g.13185_13186insAG untereinander und der Literatur	87
6.3	Auswirkungen der Mutation c.561_562delCT im DLX3-Gen	88
6.4	Eine bislang unbekannte Mutation im WDR72-Gen als Ursache einer AI2	90
6.5	Neue Amelogenesis Imperfecta-Kandidatengene	91
6.5.1	SLC4A4-Gen	93
6.5.2	FAM20A-Gen	94
6.5.3	C4orf26-Gen	95
6.5.4	LAMB3-Gen	95
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>107</b>
	Tabellenverzeichnis	107
	Abbildungsverzeichnis	109
	Klassifikation der AI	112
	Fotodokumentation der verschiedenen AI-Phänotypen	113
	Genetische Grundlagen der AI	116
	Patientenangaben	122
	Lebenslauf	127
	Ehrenwörtliche Erklärung	128

## 1 Zusammenfassung

Die Amelogenesis imperfecta (AI) ist eine erblich bedingte Bildungsstörung des Zahnschmelzes mit genetisch heterogener Grundlage. Die Diagnosestellung erfolgte in der Regel auf der Grundlage des klinischen Erscheinungsbildes des Zahnschmelzes. Aufgrund der Variabilität des Phänotyps ist dies jedoch schwierig und führt nicht selten zu Fehldiagnosen. Bis zum Jahre 2009 waren sieben Gene bekannt, die die isolierte Form der AI verursachen können.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Verfahren zur molekulargenetischen Diagnostik zu entwickeln, um betroffenen Patienten und ihren Angehörigen eine eindeutige Diagnose und Klarheit über die Ursache ihrer Erkrankung und deren Wiederholungswahrscheinlichkeit geben zu können. Des Weiteren sollten Phänotyp-Genotyp-Korrelationen bewertet und in den Kontext zur vorliegenden Literatur gesetzt werden.

Für die Studie wurden 44 Mitglieder von 17 Familien von Ärzten und Zahnärzten auf Schmelzdysplasien untersucht. Für 32 Personen erfolgte die molekulargenetische Diagnostik, wobei 24 Patienten vorab als betroffen und 8 als nicht betroffen charakterisiert wurden. Die Betroffenen zeigten ein heterogenes klinisches Bild mit folgenden Phänotypen: Hypoplasie, Hypomaturation und Hypokalzifikation, wobei auch Mischformen vorkamen. Diese Phänotypen bilden auch die Grundlage zur Klassifikation der AI und korrelieren mit Störungen in den verschiedenen Stadien der Amelogenese. Patienten, bei denen neben der für die AI typischen Schmelzanomalien weitere morphologische Veränderungen oder syndromale Erkrankungen vorlagen, wurden in dieser Untersuchung ausgeschlossen.

Zur Bestimmung des Genotyps wurde venöses Vollblut von den Patienten entnommen. Die Untersuchungen wurden in Form einer Stufendiagnostik durchgeführt: Zuerst erfolgte die Komplettssequenzierung des *Enamelin*-Gens (ENAM). In der Literatur werden ENAM-Mutationen als die häufigste Ursache für die isolierte AI beschrieben. Im Falle eines unauffälligen Befundes des ENAM-Gens wurden die übrigen sechs Gene *Amelogenin* (AMELX), *Kallikrein-related Peptidase 4* (KLK4), *Enamelysin (Matrix Metalloproteinase 20, MMP20)*, *Distal-less Homeobox 3* (DLX3), *WD Repeat-containing Protein 72* (WDR72) und *Family with sequence similarity, member H* (FAM83H) analysiert. Ein weiteres Studienziel war es, die unterschiedliche Häufigkeit betroffener Gene zu bestimmen.



Die Kandidatengenanalyse ergab pathogene Mutationen in drei der sieben Gene. In zwei Familien trat die ENAM-Mutation g.13185\_13186insAG in homozygotem oder heterozygotem Zustand auf; eine weitere Familie war von der DLX3-Mutation c.560\_561delCT betroffen. Beide Mutationen wurden bereits mehrfach als krankheitsverursachend beschrieben. In einer konsanguinen Familie konnte eine 103 kb große Deletion im WDR72-Gen mittels extern durchgeführter Exom-Sequenzierung nachgewiesen werden. Diese Veränderung wurde bislang noch nicht im Zusammenhang mit der AI beschrieben, sie ist jedoch zweifelsfrei als pathogen einzuschätzen.

In unserem Studienkollektiv war das ENAM-Gen am häufigsten betroffen. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den molekulargenetischen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. Somit kann bestätigt werden, dass Veränderungen im ENAM-Gen am häufigsten ursächlich für eine AI sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein molekulardiagnostisches Verfahren für die AI etabliert, mit dem Veränderungen in sieben Genen detektiert werden können. Das diagnostische Vorgehen wird durch den vorherrschenden Phänotyp, der Rückschluss auf das am wahrscheinlichsten betroffene Gen zulässt, bestimmt. Genotyp-Phänotyp-Vergleiche waren aufgrund zum Teil fehlender Angaben zum Phänotyp der betroffenen Patienten nur eingeschränkt möglich. Die Merkmalsausprägungen einer generalisiert-hypoplastischen AI der Sequenzvariation g.13185\_13186insAG waren bei unseren homozygoten Mutationsträgern wie in der Literatur beschrieben nachweisbar. 50 % der Patienten zeigten einen frontal offenen Biss. Die Phänotypen der heterozygoten Mutationsträger und die der Patienten mit nachgewiesener DLX3-Mutation waren nicht eruierbar. Diese Patienten konnten somit in den phänotypologischen Vergleich nicht mit einbezogen werden. Das klinische Erscheinungsbild unserer Patienten mit der WDR72-Mutation war konsistent mit einer AI vom Hypomaturationstyp bereits beschriebener Veränderungen in diesem Gen.

Die bislang in den sieben Kandidatengen identifizierten Mutationen sind für weniger als die Hälfte der AI-Fälle ursächlich. Aufgrund der hohen genetischen Heterogenität und des oftmals sporadischen Auftretens dieser Erkrankung ist zukünftig mit der Identifizierung von neuen Krankheitsgenen zu rechnen. Dabei wird die Exom-Sequenzierung (*next-generation sequencing*, NSG) eine große Wichtigkeit erlangen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die ungestörte Amelogenese

Zahnschmelz und Dentin sind Biomineralisationsprodukte. Die biologische Mineralbildung ist eine zelluläre Leistung, die von einer organischen Grundsubstanz ausgeht und nachfolgend zur Kristallisation anorganischer Mineralien führt.

Amelogenese und Dentinogenese verlaufen unterschiedlich. Dies resultiert letztendlich auch in strukturellen Unterschieden von Schmelz und Dentin; im Schmelz sind keine zellulären Bestandteile integriert (Arnold 2006).

Die Schmelzbildung ist als Teil der Odontogenese ein komplexer, genetisch kontrollierter Prozess bei dem von Ameloblasten sezernierte, extrazelluläre Matrixproteine (Schmelzproteine) mit wachsenden Kalzium-Phosphatkristallen interagieren, um die härteste und am stärksten mineralisierte Struktur des menschlichen Körpers zu bilden (Lacruz et al. 2010, Simmer und Hu 2001).

#### 2.1.1 Strukturelemente des Zahnschmelzes

Reifer humaner Zahnschmelz (Enamelum, Substantia adamantina) ist azellulär, enthält weniger als 1 % organisches Material und im Gegensatz zum Dentin kein Kollagen (Kim et al. 2008, Cho et al. 2011). Schmelz besteht aus prismatischer und interprismatischer Substanz. Den Hauptanteil bilden anorganische Kalzium-Phosphatkristalle (Hydroxylapatitkristalle). Diese Kristalle haben einen annähernd hexagonalen Querschnitt und enthalten tausende, dicht gepackte Kristallite, die 87 % des Schmelzvolumens und 95 % seines Gewichts ausmachen. Sie sind ca. 169 nm lang, 40-70 nm breit und 26 nm dick.

Etwa 100 parallel angeordnete Schmelzkristalle liegen dicht beieinander und bilden ein sog. Schmelzprisma. Diese vielkantigen, arkadenförmigen länglichen Gebilde messen ca. 5 µm im Querschnitt und sind 100 µm lang, sie reichen vom darunter liegenden Dentin bis zur Zahnoberfläche. Sie stehen radiär zueinander, sind in Büscheln organisiert und verlaufen schraubenartig.

Die Prismenverbände können unterschiedlich konfiguriert sein: Man unterscheidet den Schlüssellochtyp und den Pferdehuftyp. Die verschiedenen räumlichen

Anordnungen der Prismen führen zu lichtmikroskopischen Charakteristika wie Schreger-Hunter-Streifung, Retzius-Linien, Perikymatien und Schmelzkolben. Untereinander verbunden werden die Prismen durch die mineralisierte interprismatische Substanz, die auch aus Kristalliten aufgebaut ist. Diese sind hier diffus angeordnet.

Zahnschmelz ist je nach Lokalisation 1 - 2,5 mm dick. Milchzähne und bleibende Zähne weisen an der Schmelz-Dentin-Grenze und an der Schmelzoberfläche dünne, prismenfreie Bereiche auf (Simmer und Hu 2001, Linß und Fanghänel 1999, Koch 2007, Eckardt 2001, Arnold 2006, Umland 2003, Dörr 2009).

### 2.1.2 Phasen der Schmelzbildung und Ameloblastenfunktion

Die Schmelzbildung beginnt im Glockenstadium der Zahnentwicklung und kann in drei funktionelle Phasen mit insgesamt sechs Stadien, dargestellt in Abbildung 1, unterteilt werden:

- Präsekretorische Phase: Stadium 1 bis 3
- Sekretorische Phase: Stadium 4 und 5
- Maturationsphase: Stadium 7

Stadium 6 repräsentiert eine nicht funktionelle Ruhe- oder Übergangsphase zwischen Sekretion und Maturation in der die Ameloblasten einer morphologischen Umstrukturierung unterliegen:

- Transitionsphase: Stadium 6

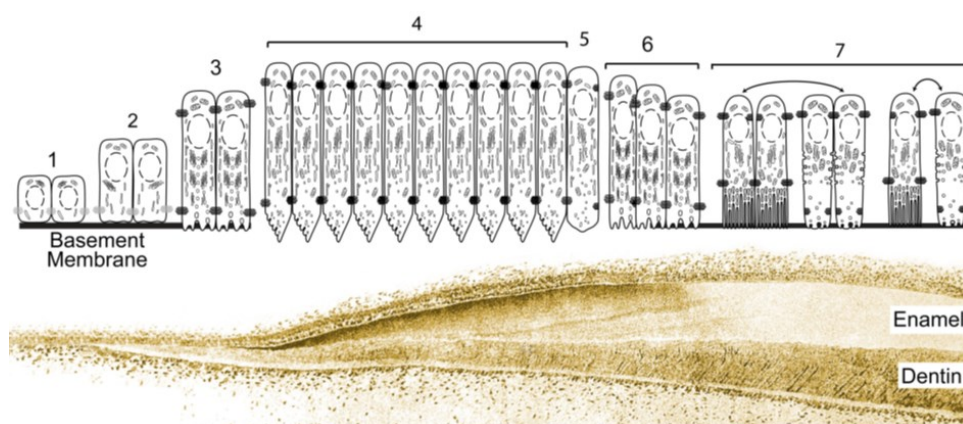


Abb. 1: Stadien der Amelogenese (aus Hu et al. 2007)

Die Charakterisierung dieser Phasen ist einerseits aus den morphologischen Veränderungen der schmelzbildenden Zellen (Ameloblasten, Adamantoblasten) abzuleiten, und andererseits sind sie mit dem Auftreten der extrazellären Matrix assoziiert (Lacruz et al. 2010).

Die Ameloblasten gehen aus den Zellen des inneren Schmelzepithels des Schmelzorgans hervor. Zahnschmelz ist somit ektodermalen Ursprungs (Arnold 2006). Ihrer Doppelfunktion entsprechend durchlaufen sie abwechselnd unterschiedlich funktionelle und morphologische Stadien: Die sekretorische Phase ist gekennzeichnet durch unregelmäßige apikale Fortsätze, in der resorptiven Phase besitzen die Ameloblasten eine glatte apikale Zellmembran. Sie können somit Schmelzmatrixproteine produzieren und sezernieren. Diese werden mit zunehmender Mineralisation durch Proteinasen (v.a. Metalloproteinasen und Serin-Proteinasen) und alkalischen Phosphatasen abgebaut und wiederum durch Ameloblasten abtransportiert (Koch 2007, Arnold 2006). Aus jedem Ameloblasten entsteht ein Schmelzprisma (Linß und Fanghänel 1999, Dörr 2009).

Die Amelogenese verläuft simultan zur Dentinogenese (diese beginnt jedoch etwas früher als die Schmelzbildung). Beide Vorgänge beginnen an der Basallamina. Diese enthält, wie viele Gewebe epithelialen Ursprungs Kollagen Typ IV und das Glycoprotein Laminin 1 und 5; sie wird später die Schmelz-Dentin-Grenze (SDG) darstellen (Simmer und Hu 2001, Hu et al. 2007).

Schmelz und Dentin entwickeln sich also aus zwei unterschiedlichen Keimblättern: Dentinoblasten gehen aus Zellen des Pulpamesenchyms der Zahnpapille hervor. Dentin ist daher mesodermalen Ursprungs. Zwischen beiden Geweben, dem Schmelzepithel und dem Pulpamesenchym, entwickelt sich eine Induktionskaskade, die wechselseitig die Differenzierung von Dentin und Schmelz bewirkt (Arnold 2006, Schroeder 1997).

### **Präsekretorische Phase**

Während der präsekretorischen Phase differenzieren sich die Ameloblasten: Sie verlieren die Basalmembran, ändern ihre Polarität und generieren ein beträchtliches System zur Proteinsynthese (Lacruz et al. 2010, Koch 2007). Die großen, säulenartigen sekretorischen Ameloblasten besitzen einen apikalen (sekretorischen) und einen basalen Pol. Am apikalen Pol entwickeln sie den sog. Tomes-Fortsatz. Dieser Fortsatz verfügt über sekretorische und non-

sekretorische Regionen und bildet die architektonische Basis für die Organisation der Schmelzkristallite in prismatische und interprismatische Substanz (Hu et al. 2007).

Die Schmelzmatrixproteine werden im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat am apikalen Pol synthetisiert und gelangen dann als Matrixgranula von Amelogeninen (90 %) und Non-Amelogeninen (10 %; v.a. Enamelin, Ameloblastin, Proteinase) in den Tomes-Fortsatz.

### **Bildung der Schmelz-Dentin-Grenze und initiale Schmelzmatrixsekretion**

Die bereits erwähnte Basallamina spielt eine wichtige Rolle für den regelrechten Ablauf der Amelogenese. Vor dem Sekretionsstadium hat das innere Schmelzepithel Kontakt zur Basallamina, ihre Degeneration ist jedoch nach Beginn der Ameloblastendifferenzierung unerlässlich (Hu et al. 2007, Simmer et al. 2010).

Der Ameloblastenschicht gegenüberliegend haben sich die oberflächlich gelegenen Zellen der Zahnpapille unter dem Einfluss des inneren Schmelzepithels durch Freisetzung des *Bone Morphogenic Protein* (BMP) und *Fibroblast Growth Factor* (FGF) aneinandergereiht und sich über Präodontoblasten zu hochdifferenzierten Odontoblasten (Dentinbildner) entwickelt (Linß und Fanghänel 1999, Arnold 2006).

Odontoblasten initiieren die Sekretion einer extrazellulären Matrix und sezernieren Prädentin, welches überwiegend Typ I-Kollagen enthält. Die Kollagenmoleküle fügen sich strangartig aneinander und richten sich zentrifugal - in Richtung Ameloblasten - aus (Simmer und Hu 2001). Mit der Mineralisation des Prädentins zum Dentin nehmen die Ameloblasten ihre Sekretionsfunktion auf: Sie senden Fortsätze durch die degenerierende Basallamina und sezernieren Schmelzproteine auf die Außenseite des darunter liegenden Dentins, das von einigen penetriert wird (Simmer et al. 2010).

### **Sekretorische Phase**

Nach Bildung der SDG und Mineralisation der ersten dünnen aprismatischen Schmelzschicht entwickeln die sekretorischen Ameloblasten den Tomes-Fortsatz, an dessen Seitenflächen und Basis die Schmelzmatrixproteine schubweise sezerniert werden und durch Matrixapposition die komplette Schmelzschicht angelegt wird. Diese Matrix bleibt, trotz sofort einsetzender

Mineralisation, bis zur darauf folgenden Maturation aber nur teilweise mineralisiert. In der Sekretionsphase erfolgt vorrangig die Elongation der Schmelzkristalle (Lacruz et al. 2010). Die sezernierten Schmelzproteine reichern sich entlang der sekretorischen Ameloblastenmembran an und bilden unter dem Einfluss von Enamelin eine Mineralisationsfront (Chan et al. 2010). Noch während der fortdauernden Sekretion kommt es zum Rückzug der Mineralisationsfront und des Tomes-Fortsatzes, während die Schmelzkristalle ca. 4  $\mu\text{m}/\text{d}$  an Länge zunehmen.

Wie oben erwähnt, ist der Tomes-Fortsatz verantwortlich für die Organisation der Schmelzkristalle in prismatische und interprismatische Substanz. Kristallite, die im Bereich der sekretorischen Region elongieren, bilden prismatischen Schmelz. Wachstumsprozesse nahe den interzellulären Kontaktstellen führen zu interprismatischer Substanz. Dieses rhythmische Längenwachstum lässt eine inkrementale Schmelzstruktur mit spezifischer Streifung, den Retzius-Streifen, entstehen. Dabei repräsentiert jedes Inkrement das Elongationsprodukt eines Tages. Die Retzius-Streifen sind als Folge einer Ruhephase zwischen zwei Sekretionsphasen zu interpretieren, sie zeigen bei jedem Menschen ein individuelles Muster. Schmelzlinien, die die Zahnoberfläche erreichen, sind zum Teil makroskopisch als sog. Perikymatien sichtbar (Simmer und Hu 2001).

### **Maturationsphase**

Nach einer Transitionsphase erfolgt die Schmelzreifung (Maturation). Zwischen Sekretionsphase und Reifungsphase finden morphologische Veränderungen in der Ameloblastenschicht statt: Ein Teil der Zellen geht durch Apoptose zu Grunde, weitere verlieren an Höhe, reduzieren ihren Proteinsynthese-Apparat und verlieren den Tomes-Fortsatz. Ein weiterer Teil verbleibt im Sekretionszustand und sezerniert proteolytische Enzyme und Proteasen (MMP20 und KLK4), die die organische Matrix abbauen (Koch 2007, Lacruz et al. 2010, El-Sayed et al. 2009).

Während der Maturationsphase erfolgt die Härtung der Schmelzschicht durch Ameloblastenvermittelte Einlagerung von Mineralien (Calcium, Phosphat und Bikarbonat) sowie deren Breiten- und Dickenwachstum durch Kristallisation der Calcium-Phosphatverbindungen. Die Matrixproteine wurden vorher, ebenfalls

durch Ameloblasten, nahezu vollständig resorbiert und durch extrazelluläre Flüssigkeit ersetzt.

Das Kristallwachstum wird nun nur noch von der Konzentration der anorganischen Hauptbestandteile Kalzium und Phosphat bestimmt. Die initiale Kristallbildung geht von Octacalciumphosphat aus, welches in Hydroxylapatit (Ca:P=1:1,2) überführt wird (Arnold 2006). Hydroxylapatit  $[\text{Ca}^{2+}_{10}(\text{PO}_4^{3-})(\text{OH}^-)_2]$  liegt selten in der stabilsten Idealform vor; es existieren mehrere Apatitvarianten (Dörr 2009). Ausgereifter Zahnschmelz besteht zu über 90 Gewichtsprozenten aus den o.g. Mineralien sowie Magnesium und Natrium. Zweitgrößter Bestandteil ist Wasser (1 - 4 Gewichtsprozente). Den geringsten Anteil stellen organische Verbindungen wie verbleibende Proteine und Lipide dar (Simmer und Hu 2001).

Kennzeichnend für die Maturationsphase ist eine pH-Schwankung der die Schmelzkristalle umgebenden Flüssigkeit von Werten unter 6 - 7,2. Dies scheint aus evolutionärer Sicht sinnvoll, da säurelabile Schmelzkristalle (solche mit hohem Karbonatgehalt) während der Phasen mit niedrigen pH-Werten wieder entfernt werden (Simmer und Hu 2001). Eine zu starke Reduktion des pH-Wertes würde aber das neu gebildete Apatit sofort wieder lösen. Dies wird durch zwei Puffersysteme, die im nachfolgenden Kapitel erläutert werden, verhindert (Arnold 2006).

Somit kommt es bereits während der präeruptiven Schmelzreifung zu einer Selektion zugunsten säureresistenter Mineralien. Nach dem Zahndurchbruch erfolgen an der Schmelzoberfläche pH-Wert abhängige Mineralaustauschprozesse, die als De- und Remineralisationsvorgänge physikalisch-chemischer Natur sind. Wenn sie sich im Gleichgewicht befinden, sind sie physiologisch. Der Zahnschmelz besitzt dann keinerlei metabolische Aktivität mehr. Die Anwendung remineralisationsfördernder, v.a. fluoridhaltiger Produkte führt zu einer nachgewiesenen erhöhten Säureresistenz des Schmelzes und einer geringeren Kariesanfälligkeit (Simmer und Hu 2001, Arnold 2006).

### 2.1.3 Schmelzmatrixproteine

Auch die Matrixproteine haben unterschiedliche, zum Teil gegensätzliche Funktionen. Sie initiieren einerseits die Kristallbildung und regulieren deren Wachstum und andererseits hydrolysieren sie aber auch die Matrixproteine.

Die organische Schmelzmatrix besteht, wie oben aufgeführt, hauptsächlich aus Amelogenin (90 %) und Enamelin (5 %). Zusätzlich synthetisieren die Ameloblasten auch Ameloblastin und Proteinase, v.a. Metalloproteinase (MMP20), alkalische Phosphatase und Serin-Proteasen (KLK4), die die beiden Hauptmatrixproteine Amelogenin und Enamelin wieder abbauen (Arnold 2006, El-Sayed et al. 2009).

Eine unterschiedliche Kompartimentierung der verschiedenen Matrixproteine erlaubt die Realisierung der differierenden Funktionen: Die Metalloproteinase und die alkalische Phosphatase sind in der extrazellulären Flüssigkeit frei gelöst, die Serin-Proteasen sind an die Kristalloberfläche gebunden (Arnold 2006).

### **Amelogenin**

Der Genlocus von Amelogenin befindet sich auf dem X-Chromosom (Xp22.3-p22.1, OMIM 300391, NM\_182680). Männer haben auf der pseudoautosomalen Region des Y-Chromosoms ein weiteres *Amelogenin*-Gen (Yp11, OMIM 410000). Den Hauptbestandteil der Schmelzmatrix stellt aber das X-chromosomale Amelogenin dar (Koch 2007).

Das in einer inaktiven Form sezernierte Amelogenin wird durch die Metalloproteinasen in der Matrix aktiviert, womit die Kristallisation der Schmelzprismen eingeleitet wird (Arnold 2006). Das entstandene Protein ist hydrophil; aus der  $\beta$ -Faltblattanordnung der Moleküle (Größe ca. 20 kDa) entstehen Kompartimente (Nanosphären) in denen die initiale Kristallisation stattfindet (Koch 2007). Die Bildung einer normal dicken Schmelzschicht ist unter Abwesenheit von Amelogenin nicht möglich (Urzua et al. 2011).

Amelogenin fungiert auch als Protonenfänger in der Schmelzmatrix und verhindert so einen zu starken Abfall des pH-Wertes durch  $H^+$ -Ionen, die während der Kristallisation von Hydroxylapatit freigesetzt werden (Arnold 2006). Die Stabilisation des pH-Wertes benötigt aber noch ein weiteres Puffersystem: die Carboanhydrase. Diese kann in der apikalen Zellmembran der Ameloblasten nachgewiesen werden. Sie wird während der resorptiven Phase abgegeben und katalysiert die Reaktion von  $H^+$  und  $HCO_3^-$  zu  $H_2O$  und  $CO_2$  (Simmer et al. 2010, Arnold 2006). Die Amelogenin-Hydrolyse erfolgt durch die Serin-Proteasen an



der Kristalloberfläche, die somit das Kristallwachstum steuern. Die Abbauprodukte werden durch die Ameloblasten resorbiert.

### Enamelin

Das *Enamelin*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 4 lokalisiert (4q21, OMIM 606585, NM\_031889). Das Genprodukt stellt das größte Schmelzprotein dar. Dieses hydrophile Glycoprotein ist das wichtigste Non-Amelogenin und als 32-kDa Enamelin, dem stabilsten Spaltprodukt des ursprünglich sezernierten 186-kDa Enamelins, bedeutsam für die regelrechte Entstehung der Mineralisationsfront und die Bildung der sog. *ghost-crystals*, die die Schmelzkristallit-entstehung initiieren und das Kristalllängenwachstum regulieren (Koch 2007, Chan et al. 2010, Fan et al. 2011). Abgebaut wird das 32-kDa Enamelin von der Protease KLK4 (Hu und Yamakoshi 2003).

Abbildung 2 zeigt die Interaktion der verschiedenen Schmelzmatrixproteine.

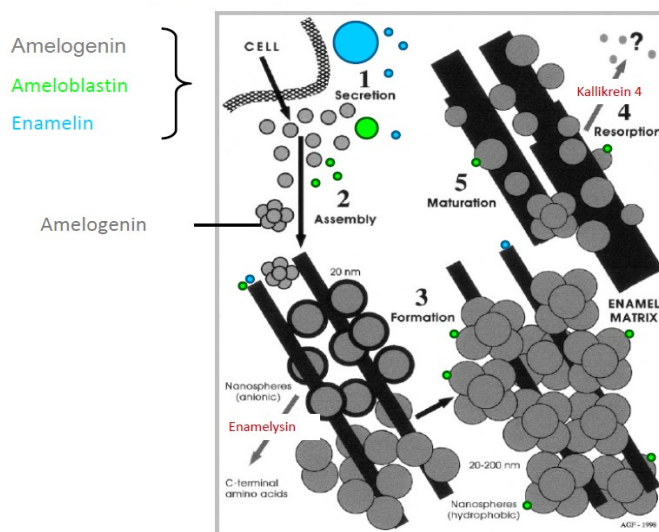


Abb. 2: Interaktion der in die Amelogenese involvierten Proteine (aus Fincham et al. 1999)

1. Synthese von Amelogenin, Enamelin und Ameloblastin in den Ameloblasten und deren extrazelluläre Sezernierung.
2. Aneinanderfügen der Amelogeninmonomere und Bildung der Kompartimente (Nanosphären) mit einem Durchmesser von 20nm und externalisierten, hydrophilen (anionischen) C-Termini.

3. Initiale Kristallisation durch elektrostatische Interaktion dieser anionischen Nanosphären mit den Schmelzkristalliten; Reduktion des anionischen Charakters der C-Termini durch Proteinase-1 und Aneinanderfügen der hydrophoben Nanosphären, die die Schmelzmatrix mit den wachsenden initialen Kristalliten stabilisieren.
4. Abbau der hydrophoben Amelogenin-Nanosphären zu kleineren Fragmenten und nicht identifizierten Produkten durch Proteinase-2; Resorption der Spaltprodukte durch Ameloblasten.
5. Schmelzreifung durch Verdickung der Schmelzkristallite.

## **2.2 Amelogenesis imperfecta (AI): Definition und Charakteristika**

Amelogenesis imperfecta (AI) bezeichnet genetisch bedingte, nicht syndrom-assoziierte Dysplasien des Zahnschmelzes (Hu et al. 2007, Kim et al. 2006). Im Jahre 2009 waren sieben Gene bekannt, die die isolierte Form der AI verursachen können (Wright et al. 2011, Urzua et al. 2011). Der Erbgang ist je nach betroffenem Gen variabel. Veränderungen in den Genen FAM83H und DLX3 führen zur autosomal dominanten Form, während Veränderungen in den Genen MMP20, WDR72 und KLK4 die rezessive Form bedingen. Mutationen im ENAM-Gen können sich abhängig von der Art der Mutation dominant oder rezessiv verhalten. Weiterhin gibt es eine X-gebundene Form, die durch Mutationen im AMELX-Gen verursacht wird (Urzua et al. 2011, Kang et al. 2009). Hollandrische Erbgänge sind nicht beschrieben.

Die AI manifestiert sich unabhängig von allgemeinen oder systemischen Erkrankungen und bezeichnet ausschließlich das Auftreten von Schmelzanomalien ohne weitere morphologische Veränderungen im Körper (Chaudhary et al. 2009, Kang et al. 2009, Kida et al. 2002).

Charakteristisch für die AI ist die Bildung von quantitativ defizientem und/oder qualitativ abnormem Schmelz, während die Dentinstruktur unverändert ist. In der Regel sind alle Zähne der ersten und zweiten Dentition betroffen; es sind aber auch lokalisierte Formen im Milch- oder permanenten Gebiss möglich (Gutierrez et al. 2012, Urzua et al. 2011, Schroeder 1997).

In der Inzidenz bestehen regionale und ethnische Unterschiede: mit einer Häufigkeit zwischen 1:718-800 (Nordschweden) und 1:16.000 (USA) tritt die AI aber relativ selten auf (Kirchmann und Zipprich 2007, Schroeder 1997).

## 2.3 Klinik

### 2.3.1 Diagnostik

Die Diagnosestellung erfolgt derzeit nach ausführlicher Eigen- und Familienanamnese mit Stammbaumauswertung und klinischer Untersuchung. Von besonderem Interesse sind Daten zur familiären Häufung (Großeltern, Eltern, Geschwister) mit Angaben zu Blutsverwandtschaft der Eltern bei vermuteten rezessiven Erbgängen sowie strukturelle Zeichen. Bildgebende Verfahren können unterstützende Hinweise geben.

Als vorherrschende klinische Manifestation zeigt sich in 60 - 73 % bei den Betroffenen eine Schmelzhypoplasie, wobei der korrekt mineralisierte Zahnschmelz zu dünn ist. Seltener tritt eine Schmelzhypomineralisation auf, die weiter in die Hypomaturation (20 - 40 %) und Hypokalzifikation (7 %) unterteilt wird. Sie ist gekennzeichnet durch einen mehr oder weniger weichen, stumpf-glanzlosen, opak weiß bis honigfarbenen Schmelz. In vielen Fällen wird ein kombinierter Phänotyp beobachtet (Schüler und Heinrich-Weltzien 2010, Kirchmann und Zipprich 2007, Chaudhary et al. 2009).

Weitere Leitsymptome sind Hypersensibilität oder Schmerzen sowie rasche Attrition der Zähne mit Verlust der vertikalen Dimension (Bisshöhe). Pathologische Gingivabefunde wie Gingivitis oder Gingivahyperplasie werden häufig begleitend beobachtet. Die Folgen sind funktionelle und ästhetische Einschränkungen; viele Patienten berichten von einem gestörten Sozialverhalten und psychischen Problemen (O'Sullivan et al. 2011).

Die AI kann zusammen mit anderen dento-fazialen Störungen auftreten. Zu diesen zählen eine verzögerte Eruption, Zahnunterzahl, Dentikel, pathologische Kronen- und Wurzelresorptionen und Taurodontismus. Des Weiteren besteht eine erhöhte Tendenz zu impaktierten bleibenden Zähnen und follikulären Zysten. Ein frontal offener Biss tritt, abhängig vom AI-Typ, mit einer Prävalenz von 30 - 60 % auf (Hedge 2012, Gutierrez et al. 2012, Becerik et al. 2009, Kirchmann und Zipprich 2007, Hart et al. 2003).

### 2.3.2 Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostisch ist die AI von folgenden Erkrankungen abzugrenzen:

- Dentinogenesis imperfecta
- Dentalfluorose
- Karies
- Molaren-Inzisiven-Hypomineralisation
- Hypoplasien unklarer Genese
- Medikamentös bedingte Schmelzveränderungen, z.B. Tetracyclin-induzierte Strukturstörung.

Bei nachfolgend genannten multipel kongenitalen Anomalien prägen u.a. AI-typische Schmelzdyplasien den Phänotyp:

- Jalili-Syndrom
- Kohlschütter-Tönz-Syndrom
- McGibbon-Syndrom
- Axenfeld-Rieger-Syndrom
- Epidermolysis bullosa
- Ektodermale Dysplasie, wie z.B. TDO-Syndrom.

## 2.4 Phänotypische Klassifikation der Amelogenesis imperfecta

In der vorliegenden Literatur hat sich bislang keine einheitliche Klassifikation etablieren können. Je nach Autor werden unterschiedliche Kriterien zugrunde gelegt.

Finn nahm erstmalig 1938 eine Differenzierung von Zahnhartsubstanzanomalien, basierend auf klinischen Kriterien, in Dentin- und Schmelzveränderungen vor (Aldred et al. 2003). Dies könnte als Abgrenzung der AI von der Dentinogenesis imperfecta (DI) interpretiert werden.

Eine Klassifikation der AI ist aufgrund der klinischen und genetischen Heterogenität sowie der oftmals kontrovers diskutierten Nosologie schwierig. Seit der Einteilung von Weinmann et al. (1945) existieren unterschiedliche Klassifikationssysteme der AI, wobei keines die Vielfalt der Subtypen zufriedenstellend reflektiert.

Die meisten Klassifikationen der AI sind, wie die häufig zitierte Klassifikation nach Witkop (1988), vom vorherrschenden Phänotyp und dem zugrunde liegenden Erbgang abgeleitet. Witkop (1988) unterscheidet in Tabelle 41 (Anhang) vier verschiedene Hauptgruppen mit mehreren Subtypen, was zu Schwierigkeiten in der klinischen Anwendung dieser Klassifikation führt (Hu und Yamakoshi 2003). Spätere Klassifikationssysteme, wie beispielsweise von Aldred und Crawford (1995) vorgeschlagen, schließen auch molekulare und biochemische Kriterien ein.

Aufgrund immer besser werdender Einblicke in die Genetik der AI diskutierten El-Sayed et al. (2009) die Etablierung einer primär auf dem Phänotyp basierenden Klassifikation. Hu und Yamakoshi (2003) verweisen dagegen auf die perspektivische Abgrenzung der verschiedenen AI-Formen anhand der beteiligten Gene. Beide Ansätze bilden die Grundlage für die Klassifikation in dieser Arbeit, die somit in modifizierter Form dem Vorschlag von Witkop (1988) folgt. Die strikt Erbgang-assoziierte Unterteilung der Hauptgruppen in die verschiedenen Erscheinungsbilder erschien jedoch für die Anwendung in der Praxis zu unübersichtlich und verwirrend. Stattdessen erfolgte eine vereinfachende Subklassifizierung nach Symptomausprägung und/oder betroffenem Gen.

### **Klassifikation mit phänomenologischer Hauptgruppenunterteilung und Gen-assoziiierter Subklassifizierung**

Der vorherrschende Phänotyp - der Schmelz wird auf Dicke, Härte, Rauigkeit sowie Farbe und Röntgenkontrast beurteilt - soll dem Zahnarzt eine schnelle und unkomplizierte Einordnung einer Schmelzdysplasie, besonders im Hinblick auf eine nachfolgende molekulargenetische Untersuchung, erlauben. Die Auswertung aller o.g. Kriterien ergibt drei unterschiedliche Phänotypen, die mit Störungen in den verschiedenen Stadien der Amelogenese korrelieren, und eine erste Orientierung auf das oder die betroffenen Gene geben.

Es resultieren folgende AI-Grundtypen: die **hypoplastische AI**, die **Hypomaturationsform** und die **hypokalzifizierte AI**. Des Weiteren ergibt sich aus der Kombination von Hypomaturation und Hypoplasie in Verbindung mit Taurodontismus eine Sonderform, die Witkop (1988) als vierte Hauptgruppe definiert. Beispielbilder im Anhang demonstrieren die morphologische Heterogenität der Erkrankung, zum Teil auch innerhalb eines Grundtyps.

#### 2.4.1 Amelogenesis imperfecta Typ I-Hypoplastischer Typ (AI1)

Bei dieser Form ist die Schmelzschicht durch eine insuffiziente Schmelzapposition während der Sekretionsphase pathologisch dünn (El-Sayed et al. 2011). Bei der schwersten Ausprägung, der Aplasie, ist nahezu kein Zahnschmelz nachweisbar (Hu et al. 2007). Die AI1 hat, je nach Mutation und Erbgang, ein variables Erscheinungsbild und kann generalisiert oder lokalisiert auftreten.

Die Zahnfarbe erscheint relativ normal oder variiert von weiß bis gelb oder bräunlich. Die Zähne haben eine mehr oder weniger raue bis glatte Oberfläche und können in Folge der reduzierten Schmelzdicke fehlende Approximalkontakte aufweisen. Ist die Schmelzschicht stark reduziert, imponieren sehr weite Approximalräume mit kleinen Zähnen und freiliegendem Dentin (Lindemeyer et al. 2010, Kim et al. 2005).

Der Schmelz ist hart, kann aber absplittern oder attritionsbedingt schneller als normal verloren gehen. Weiterhin wurden pathologische Zahnformen vor dem Durchbruch (konisch oder zylinderförmig) beschrieben (Schroeder 1997).

Man unterscheidet ubiquitär oder lokalisiert auf der Zahnkrone auftretende, grubchenartig-getüpfelte Schmelzdefekte von vertikalen Rillen, die meist in der Zervikalregion beobachtet wurden. Es wurden aber auch horizontal verlaufende Riefen, oftmals im mittleren oder okklusalen Kronendrittel, beschrieben (Kida et al. 2002, Wright 2007, Kim et al. 2005).

Radiologisch weist der Schmelz, wenn überhaupt vorhanden, eine höhere Opazität gegenüber dem Dentin auf. Der Röntgenkontrast ist also normal (Urzua et al. 2011).

Die hypoplastische AI tritt auf bei Veränderungen im ENAM-Gen und bei den meisten Mutationen im AMELX-Gen auf und lässt sich weiter in drei Subtypen unterteilen:

ENAM-Mutationen können eine lokale oder generalisierte AI bedingen, sie werden entsprechend des Schweregrads als **AI1B** oder **AI1C** (schwerer betroffen, mit oder ohne offenen Biss) bezeichnet und autosomal dominant oder rezessiv vererbt (Kim et al. 2005).

AMELX-Mutationen werden als **AIH1** oder **X-linked 1-Form** geschlechtsgebunden auf dem X-Chromosom vererbt. Obwohl Schmelzhypoplasien bei den meisten Veränderungen im AMELX-Gen dominieren, wird bei einigen Mutationen hypomaturierter Schmelz beobachtet. Männer mit AMELX-assoziiierter

Hypoplasie weisen ein variables Defektmuster auf, das sich von dem der Frauen unterscheidet: der Schmelz kann auf bis zu  $1/4$  -  $1/8$  reduziert sein, Prismenstrukturen können fehlen. Die Oberfläche ist glatt, glänzend und hellbraun gefärbt. Der hypomaturationsstypische Phänotyp ist unter 2.4.2 näher beschrieben. Bei heterozygoten Frauen zeigen sich vertikale Bänder von normalem und hypoplastischem Schmelz, die zufällig und asymmetrisch verteilt sind. Diese Erscheinung wird mit der Lyon-Hypothese erklärt (Urzua et al. 2011, Schröder 1997, Aldred et al. 1992a, Aldred et al. 1992b, Crawford und Aldred 1992).

#### **2.4.2 Amelogenesis imperfecta Typ II-Hypomaturationsstyp (AI2)**

Dieser Typ resultiert aus einer gestörten Rückresorption der Schmelzproteine in der Maturationsphase (Kim et al. 2008). Der unreife Schmelz ist nach dem Durchbruch normal dick, jedoch in seiner Härte reduziert und spröde, was zu beschleunigten, zum Teil ausgedehnten Schmelzverlusten durch Attrition oder Absplittern führt (El-Sayed et al. 2011).

Die variierende Zahnfarbe ist gekennzeichnet durch eine abnorme Transparenz mit weißen bis orange-braunen, fleckigen Verfärbungen. Weißlich-opake Läsionen können einer Dentalfurorose ähneln und zeigen sich vorzugsweise unmittelbar nach dem Zahndurchbruch. Später können die Zähne tiefbraun erscheinen (El-Sayed et al. 2009, Crawford et al. 2007, Schroeder 1997).

Die Schmelzoberfläche erscheint matter mit einer weniger reflektierenden Oberfläche, sie ist glatt bis porös und kann auch Grübchen oder Furchen aufweisen (Schroeder 1997, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Die Zähne sind nach dem Durchbruch von normaler Größe und Form; die Approximalkontakte sind nicht aufgehoben (Hu et al. 2007, Schroeder 1997). Durch die oftmals umfangreichen posteruptiven Schmelzverluste kann es aber auch bei dieser Form zu pathologischen Kronenformen und interdentaler Lückenbildung kommen (El-Sayed et al. 2009, El-Sayed et al. 2011).

Die radiologische Opazität von Schmelz und Dentin sind vergleichbar (Urzua et al. 2011).

Dieser AI-Typ tritt bei rezessiven Mutationen in den Genen **KLK4 (AI2A1)**, **MMP20 (AI2A2)** oder **WDR72 (AI2A3)** auf (Kang et al. 2009, Urzua et al. 2011). Auch einige Mutationen im **AMELX**-Gen bedingen bei Männern diesen Phänotyp mit fahlgelb-fleckig, rauem Schmelz (Aldred et al. 1992a, Urzua et al. 2011).

Einige Autoren berichten von einem charakteristischen Muster mit weißen zervikalen Opazitäten und braunen koronalen Verfärbungen (Wright 2007, Urzua et al. 2011).

#### **2.4.3 Amelogenesis imperfecta Typ III-Hypokalzifikationstyp (AI3)**

Auch bei dieser Form ist die Schmelzschicht primär nicht reduziert und die Zahnform vor dem Durchbruch normal. Die gestörte Mineralisation führt aber zu weichem Schmelz von käseartiger Konsistenz, so dass dieser rasch nach dem Durchbruch attritionsbedingt verloren geht (Urzua et al. 2011, Kim et al. 2008). In der Praxis lässt sich der hypomineralisierte Zahnschmelz leicht mit Instrumenten ablösen (El-Sayed et al. 2011).

Die abradierten Zähne können ihre physiologische Kronenanatomie bis hin zu stark konischen Formen verlieren, die Oberfläche erscheint rau und lagert vermehrt Farbstoffe ein. Hypersensitivitäten auf thermische Reize sind oftmals die Folge (Lee et al. 2008, Kim et al. 2008).

Die Zahnfarbe variiert auch hier: Gerade durchgebrochene Zähne sind von weiß-opaken bis orange-braunen Schmelz bedeckt, später sind gelb-braun-schwarze Zahnfarben möglich (Schroeder 1997). Die Zervikalregion soll weniger betroffen sein als die Zahnkrone (Urzua et al. 2011).

Die radiologische Opazität ist im Vergleich zum Dentin geringer (Urzua et al. 2011). Hypokalzifizierter Schmelz korreliert mit dominant vererbten Veränderungen im Gen FAM83H (Kang et al. 2009).

#### **2.4.4 Amelogenesis imperfecta Typ IV–hypoplastisch-Hypomaturationsstyp mit Taurodontismus (AI4)**

Eine Mutation in der Homeodomäne des DLX3-Gens bedingt eine AI mit kombiniert hypoplastisch-hypomaturiertem Phänotyp in Verbindung mit Taurodontismus. Auch hier liegt ein dominanter Erbgang zugrunde (Dong et al. 2005).

Der Phänotyp ist gekennzeichnet durch dünnen, harten, gelb-braun verfärbten Schmelz und verkleinerten Zahnkronen mit fehlenden Approximalkontakten. Attritionsbedingte Schmelzverluste spielen eine untergeordnete Rolle (Dong et al. 2005, Urzua et al. 2011).

Taurodontismus (grsch. tauros, Stier) bezeichnet eine typische Formveränderung der Molaren und Prämolaren ohne Krankheitswert. Taurodontische Zähne



weisen eine in apiko-okklusaler Richtung deutlich vergrößerte Pulpakammer auf. Die normal geformte Zahnkrone wird von einem breiten, massiven Wurzelkörper getragen, der erst weit apikal in Mehrwurzigkeit übergeht. Taurodontismus resultiert wahrscheinlich aus einer fehlerhaften, zu späten Einstülpung der Hertwigschen Epithelscheide und tritt vermehrt im Zusammenhang mit AI, Lobodontie, Epidermolysis bullosa und dem Klinefelter-Syndrom auf (Steffen 2007, Cichon und Grimm 1998).

## **2.5 Genetische Grundlagen der Amelogenesis imperfecta**

Wie oben beschrieben, ist die Zahnschmelzbildung ein hoch spezialisierter, genetisch kontrollierter Prozess, der auf vielfältige Weise gestört werden kann. Störungen der Schmelzbildung führen zu mehr oder weniger ausgeprägten bleibenden Defekten.

Im Falle der AI sind Mutationen in Genen, die für Schmelzproteine kodieren, ursächlich. Diese Schmelzproteine sind spezifisch für die Schmelzbildung. Infolgedessen haben Veränderungen in den entsprechenden Genen keine Auswirkungen auf andere Strukturen im Körper (Simmer und Hu 2001).

### **Aktueller Stand der molekulargenetischen Diagnostik**

Ausgangspunkt für die Arbeit war, dass für die AI in Deutschland routinemäßig keine molekulargenetische Untersuchung angeboten wurde; diagnostische Verfahren waren bis dahin Bestandteil von Forschungsprojekten. Immer besser werdende Einblicke in die Pathogenese mit der Auffindung weiterer Schlüsselgene und „hot spots“ bestätigten jedoch bei immer mehr Patienten Schmelzdyplasien als Folge von AI-assoziierten Genveränderungen. Somit war die Entwicklung und Validierung bzw. Akkreditierung eines standardisierten molekulargenetischen diagnostischen Verfahrens erforderlich.

### 2.5.1 Kandidatengene und verursachende Mutationen der Amelogenesis imperfecta

Tabelle 1 zeigt die im Jahre 2009 bekannten Gene, die die isolierte Form der AI bedingen können.

Tab. 1: Kandidatengene der AI

Gen	OMIM	Chromosomen-Lokalisation	Summe bisher bekannter Mutationen	Erbgang	Quelle
Amelogenin (AMELX)	300391	Xp22.1-p22.3	15	X-gebunden	Urzua et al. 2011, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Enamelin (ENAM)	606585	4q11-q21	10	Autosomal dominant/ autosomal rezessiv	Urzua et al. 2011, Chan et al. 2010, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Enamelysin (MMP20)	604629	11q22.3-q23	4	Autosomal rezessiv	Urzua et al. 2011, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Kallikrein 4 (KLK4)	603767	19q13.3-q13.4	1	Autosomal rezessiv	Urzua et al. 2011, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Distal less (DLX3)	600525	17q21.3-q22	1	Autosomal dominant	Urzua et al. 2011, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Family with sequence similarity83, member H (FAM83H)	611927	8q24.3	16	Autosomal dominant	Urzua et al. 2011, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
WD Repeat-containing Protein 72 (WDR72)	613214	15q21.3	5	Autosomal rezessiv	Lee et al. 2010, El-Sayed et al. 2009 und 2011, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>

Die bislang in diesen Genen identifizierten Mutationen sind in Tabelle 42 (Anhang) zusammengefasst. Sie sind für weniger als die Hälfte der AI-Fälle ursächlich (Urzua et al. 2011). Kim et al. (2008) sehen sogar nur für etwa 25 % aller AI-Fälle die Ursache in Veränderungen der genannten Kandidatengene.

### 2.5.2 X-chromosomal vererbte Amelogenesis Imperfecta (XAI)

Bei der geschlechtsgebundenen Form wurden bis heute 15 Mutationen im Bereich des Amelogenin-Genlocus Xp22.1-p22.3 auf dem distalen kurzen Arm des X-Chromosoms identifiziert (**AIH1, X-linked1-Form, OMIM 301200**), die bei Männern mit variabel ausgeprägten hypoplastischen und/oder hypomineralisierten (hypomaturierten) Schmelzdefekten assoziiert sind (Urzua et al. 2011). Es ist anzunehmen, dass das AMELX-Gen mit rezessiver Wirkung vererbt wird, da heterozygote Frauen oftmals nicht betroffen sind oder nur abgeschwächte Zeichen der Erkrankung zeigen.

Aldred et al. (1992) publizierten noch einen zweiten Genlocus Xq22-28 auf dem langen Arm (**AIH3, X-linked2-Form, OMIM 301201**). Diesem, nicht näher bezeichneten Gen auf dem X-Chromosom wird ebenfalls Bedeutung für die Pathogenese der AI zugemessen (Aldred et al. 1992a, Wright 2007). Urzua et al. (2011) erwähnen auch die Region Xp24-p27.1 als genetisch gesichert. Die Prävalenz der XAI wird mit ca. 5 - 10 % angegeben (Chan et al. 2011, Hu et Yamakoshi 2003).

AMELX-Mutationen (= Deletionen, *Missense*- und *Nonsense*-Mutationen) lassen sich in drei Kategorien zusammenfassen:

- Signalpeptid-Mutationen
- Mutationen am Amino-Terminus
- Mutationen am Carboxy-Terminus

#### Signalpeptid-Mutationen

Die Bedeutung des AMELX-Gens für die Bildung einer normal dicken Schmelzschicht wird durch die ersten vier Mutationen in Tabelle 41 (Anhang) verdeutlicht, die durch Beeinflussung des Signalpeptids (Signalsequenz) eine reduzierte Schmelzdicke und somit eine (glatt) hypoplastische AI bedingen. Es wird kein entsprechendes Protein sezerniert (Urzua et al. 2011, Wright et al. 2003).

#### Mutationen am Amino-Terminus

Der Großteil der AMELX-Mutationen beeinflusst funktionelle Bereiche am Molekülende. Drei *Missense*-Mutationen und eine *Frameshift*-Mutation im Amino-Terminus führen aufgrund einer Amelogenin-Retention zu hypomaturiertem

Schmelz (fahlgelb-braune Zahnfarben) mit Hypoplasien unterschiedlichen Ausmaßes (Urzua et al. 2011, Wright 2007, Wright et al. 2003). Diese Domäne enthält eine Tyrosin-reiche Peptidregion (TRAP, *tyrosine-rich amelogenin peptide*) und zusätzlich zu Stellen mit proteolytischer Aktivität noch eine Region mit hohem Bindungspotential für Carbohydrate und Cytokeratine. Mutationsbedingt kommt es zu Änderungen der Bindungskapazität und Herabsetzung proteolytischer Prozesse im Protein mit Ausprägung des o.g. Phänotyps (Urzua et al. 2011, Wright et al. 2003).

### **Mutationen am Carboxy-Terminus**

Der Ausfall des Carboxy-Terminus (C-Terminus) resultiert in einem Phänotyp mit glattem, hypoplastischen Schmelz (Urzua et al. 2011, Wright et al. 2003). Die Schmelzschicht kann bis auf ein Minimum reduziert sein (Wright et al. 2003). Der C-Terminus ist wichtig für die Nanosphärenbildung und somit für die Kristallisation. Störungen in diesem Bereich führen zu einem abrupten Abbruch der Amelogenese durch Einbau eines Stopp-Codons und somit zu einem verkürzten, funktionslosen Protein. Es sind sechs solcher *Nonsense*-Mutationen für diesen Bereich bekannt (Urzua et al. 2011, Wright 2007, Wright et al. 2003).

### **2.5.3 Autosomal-dominant vererbte Amelogenesis Imperfecta (ADAI)**

Bei diesem Erbgang ist das AI-bedingende Gen (ENAM, FAM83H, DLX3) auf einem Autosom lokalisiert. Der entsprechende Phänotyp (Hypoplasie und/oder Hypomineralisation) zeigt sich bereits bei Heterozygotie, da das krankmachende Gen über das Normale dominiert. Die autosomal dominante AI wird oft als die am häufigsten vorkommende Form bezeichnet. Sie zeigt eine große Variabilität in der klinischen Ausprägung, was das Erstellen von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen erschwert. *Enamelin* wird als das am häufigsten veränderte Gen beschrieben (Urzua et al. 2011, Hart et al. 2003).

### **ENAM-Mutationen (AIH2, AI1B, OMIM 104500)**

Mutationen im *Enamelin*-Gen können sich, in Abhängigkeit von der Mutationsart, dominant oder rezessiv verhalten.

Derzeit sind neun ENAM-Mutationen identifiziert, die dominant vererbt werden. Sie bedingen lokale oder generalisierte Schmelzhypoplasien, die oft mit

deutlichen horizontalen Rillen, einhergehen. Der Schweregrad der Schmelzdefekte kann, sogar zwischen Patienten mit der gleichen Mutation, stark variieren. Generell zeigen die Betroffenen mit dominantem Erbgang einen weniger schwer ausgeprägten Phänotyp als Patienten mit rezessiven ENAM-Mutationen (Kim et al. 2005, Urzua et al. 2011).

Bei fünf Veränderungen wird die Aminosäuresequenz durch den Austausch einzelner Basen gestört (vier Transversionen und eine Transition): Die Mutationen in Exon 5 und 10 sind *Nonsense*-Mutationen, die Transversion in Exon 9 ist eine *Missense*-Mutation. Zwei Mutationen in Intron 9 und Exon 10 sind Deletionen.

Weiterhin sind noch zwei Insertionen in Exon 10 beschrieben, die sowohl in dominanten als auch in rezessiven Erbgängen nachgewiesen wurden und als *Frameshift*-Mutation zu einer Verschiebung des Ableserahmens auf der DNA führen: Diejenigen Anteile der Aminosäuresequenz, die hinter der Insertion abgelesen werden, sind komplett geändert.

#### **FAM83H-Mutationen (ADHCAI, OMIM 130900)**

Alle derzeit bekannten 16 Mutationen in diesem Gen sind in Exon 5 lokalisiert, sie zeichnen sich durch eine vollständige Penetranz aus. Neun Transitionen, fünf Transversionen und zwei Deletionen führen zu einem verkürzten Protein mit weniger als 700 Aminosäuren, was zu einer dominanten, konstanten Ausprägung des hypokalzifizierten Phänotyps führt (Urzua et al. 2011). Im Gegensatz zu den anderen Kandidatengenen kodiert FAM83H für kein Matrixprotein; seine Funktion ist ungeklärt. Es ist aber wahrscheinlich, dass der mutationsbedingt verkürzte C-Terminus des Proteins für die unzulängliche Kalzifikation verantwortlich ist (Lee et al. 2008).

#### **DLX3-Mutationen (AIHHT, OMIM 104510)**

Eine Mutation innerhalb der Homeodomäne des DLX3-Gens ist im Zusammenhang mit der hypoplastisch/hypomaturierten AI und Taurodontismus beschrieben. Die Homeodomäne ist in Exon 2 und 3 lokalisiert. Die Veränderung, eine 2 bp-Deletion in Exon 3 am C-Terminus der Homeodomäne, ist eine *Frameshift*-Mutation mit hoher Penetranz, die zur Insertion eines Stopp-Codons und zu einem verkürzten Protein führt (Dong et al. 2005, Urzua et al. 2011).

Eine weitere DLX3-Mutation in Exon 3 bedingt die Ausbildung eines anderen Phänotyps, man spricht hierbei von allelischer Heterogenität. Diese 4 bp-Deletion liegt außerhalb der Homeodomäne. Sie ist zwar ebenfalls mit Zahnanomalien ähnlich der AIHHT assoziiert, im Gegensatz dazu zeigen die Betroffenen jedoch zusätzlich Haar- und Knochenveränderungen. Dieser Symptomkomplex wird als Tricho-dento-ossäres Syndrom (TDO, OMIM 190320) beschrieben. Das TDO-Syndrom wird autosomal dominant vererbt und ist von der AIHHT zu differenzieren (Dong et al. 2005).

#### **2.5.4 Autosomal-rezessiv vererbte Amelogenesis Imperfecta (ARAI)**

Aktuell sind vier Gene (ENAM, MMP20, KLK4, WDR72) mit dieser Form der AI assoziiert. Auch bei diesem Erbgang liegt das merkmalsbedingende Gen auf einem Autosom. Die Merkmalsausprägung erfolgt aber nur bei Homozygotie, da das normale Gen über das Krankmachende dominiert. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von autosomal-rezessiven Erkrankungen ist bei Familien mit Verwandtenehe (Konsanguinität) erhöht.

##### **KLK4-Mutationen (AI2A1, OMIM 204700)**

Eine *Nonsense*-Mutation in Exon 4 dieses Gens führt zu einer Verkürzung der Serin-Protease, wobei wichtige Bereiche mit katalytischer Aktivität nicht translatiert werden. Das Enzym ist somit funktionslos, Schmelzmatrixproteine können nicht gespalten werden. Folglich wird die Schmelzreifung durch Protein-Retention und Störung des Kristallwachstums unterbrochen, was in pigmentiert-hypomaturierten Schmelzdefekten mit dunkelgelben Verfärbungen sichtbar wird (Urzua et al. 2011, El-Sayed et al. 2009, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

##### **MMP20-Mutationen (AI2A2, OMIM 612529)**

Die vier Mutationen in Exon 1, Exon 5, Exon 6 und Intron 6 resultieren in einer starken Verminderung oder einem kompletten Verlust der katalytischen Aktivität dieses zweiten Schmelzmatrix-modifizierenden Enzyms und bedingen, ähnlich der AI2A1 einen pigmentierten Hypomaturationstyp. Im Gegensatz glänzen die Zähne hier mehr und die gräulich-braunen Verfärbungen sind weniger homogen (Urzua et al. 2011, El-Sayed et al. 2009, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

**WDR72-Mutationen (AI2A3, OMIM 613211)**

Das WDR72-Gen besteht aus 19 codierenden Exons, seine Funktion ist noch unbekannt. Auch die Pathogenese ist wenig dokumentiert (El-Sayed et al. 2009). Fünf bekannte Mutationen in diesem Gen sind mit Hypomaturation assoziiert. Eine Deletion in Exon 12 führt zu einer Verkürzung des Proteins am N-Terminus (Lee et al. 2010). Eine weitere Deletion in Exon 16 führt zu einer *Frameshift*-Mutation. Zwei Mutationen in Exon 15 und 17 resultieren im Einbau eines verfrühten Stopp-Codons (El-Sayed et al. 2009). Der Pathomechanismus einer zweiten Veränderung in Exon 15, einer *Nonsense*-Mutation, ist unbekannt (El-Sayed et al. 2011).

**ENAM-Mutationen (AIH2,AI1C, OMIM 204650)**

Die zwei Mutationen in Exon 10 sind bereits in Kap. 2.5.3 beschrieben. Bei beiden Mutationen führt nur eine homozygote oder compound-heterozygote Veränderung zur Ausprägung des kompletten, d.h. generalisiert hypoplastischen Phänotyps mit Malokklusion in Form eines offenen Bisses. Heterozygote Träger dieser Mutationen zeigen mild ausgeprägte, lokalisierte grubchenartig hypoplastische Schmelzdefekte.

### 3 Ziele der Arbeit

Für die hereditäre Schmelzbildungsstörung der AI wurde bis zum Jahre 2009 in Deutschland routinemäßig keine molekulargenetische Diagnostik angeboten. Für die betroffenen Patienten und ihre Angehörigen ist jedoch eine eindeutige Diagnose wesentlich, um Ansprüche gegenüber der Krankenkasse für eine umfassende und teure zahnärztliche Versorgung geltend machen zu können und Klarheit über die Art der Erkrankung und über eine ggf. hereditäre Grundlage zu erlangen. Da eine Diagnose aufgrund der alleinigen klinischen Symptomatik schwierig ist, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Verfahren zur molekulargenetischen Diagnostik der AI zu entwickeln.

Bis zum Jahre 2009 waren sieben Gene bekannt, die eine isolierte, nicht-syndromale Form der AI verursachen. Aufgrund des oftmals sporadischen Auftretens der AI innerhalb einer Familie ist die Ermittlung eines Erbgangs häufig schwierig. Daher wurde bei allen betroffenen Patienten zunächst das ENAM-Gen mittels Sequenzierung analysiert, da es das am häufigsten veränderte Gen bei einer AI ist. Erst bei einem unauffälligen Befund für ENAM wurden die übrigen sechs Gene AMELX, KLK4, MMP20, DLX3, WDR72 und FAM83H auf bereits beschriebene Mutationen untersucht. Dabei sollten, wenn möglich, folgende Fragen geklärt werden:

- Lassen sich Veränderungen in einem bestimmten Gen einem bestimmten Phänotyp zuordnen?
- Sind Mutationen im gleichen Gen immer mit dem gleichen Erbgang assoziiert oder gibt es Variationen in der Penetranz einzelner Mutationen?
- Korreliert der Mutationstyp mit dem klinischen Bild der AI?
- Sind die bekannten Gene unterschiedlich häufig betroffen?

Anhand der Ergebnisse könnte im Idealfall ein diagnostischer Ablauf für die molekulargenetische Untersuchung der AI folgen. Die phänotypische Beschreibung im Befund des behandelnden Zahnarztes, der Erbgang sowie die Kenntnisse über die Mutationshäufigkeiten der einzelnen Gene könnten eine Entscheidungshilfe sein, welche Gene in welcher Reihenfolge zu untersuchen sind. Dadurch könnte das diagnostische Verfahren so effizient und schnell wie möglich gestaltet werden. Patienten könnten mehr Klarheit über die Ursache ihrer Erkrankung und deren Wiederholungswahrscheinlichkeit sowie weitere Aspekte der humangenetischen Beratung erhalten.



## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Arbeitsgeräte und Materialien**

##### **Gelelektrophorese**

- Agarose-Gel-Einheit HE 33, Hoefer
- Gel Casting Kit (7x10 cm), Hoefer
- Gel-Kämme (8er Taschen)
- Power Supply Model 1000/500, Biorad
- Geldokumentationsgerät (Biometra Lichttisch) inkl. Software (Biodoc Analyze)

##### **PCR und Sequenzierung**

- Thermocycler (PTC-200, MJ Research)
- Auftragshilfe 96-well-Platten
- Kapillarsequenzier AB3130 inkl. Software

##### **Zentrifugen**

- Mini spin plus, Eppendorf
- Vakuumzentrifuge (Speedvac DNA 120, Thermo Savant)

##### **Heizblock**

- Blockthermostat BT 100, Kleinfeld

##### **Sonstiges**

- Einmalhandschuhe
- Pipetten P2, P10, P20, P100, P200 (GILSON)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Sterile Tubes (Bio Products) und Strips
- Kühl- und Gefrierschränke

- Eppendorf Kühlbox
- Spatel
- Laborflaschen, Schott (500 ml, 2l)
- Mikrowelle
- Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer
- Vortexer
- Sterilwerkbank (Hera Safe, Heraeus)
- Blautisch
- Waage
- Abfallbehälter

#### 4.1.2 Reagenzien

##### Agarose-Gel-Elektrophorese

- Agarose-Trenngel ( 1,5 %), für 100 ml, ausreichend für 2 Gele:
  - 1,5 g Agarose, Biozym
  - 100 ml 1xTBE-Puffer (10xTBE-Puffer 1:10 mit A. dest. verdünnen)
  - 16 µl SYBR-Green (GelStar, 2.000x)
- 10xTBE-Puffer, für 1 l:
  - 109 g 0,9 M Tris-(hydromethyl)aminomethan; 55 g 0,9 M Borsäure;  
7,55 g 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA
  - ad. A. dest. (1l)
- Längenstandard Marker puc8 (Fermentas):
  - 20 µl Marker + 40 µl 5-6x Loading (Fermentas oder Qiagen) + 180 µl  
1x TBE-Puffer
- 2000x SYBR-Green (Gelstar)

##### PCR

- Primer (Sequenzen und spezifische Eigenschaften der einzelnen Primerpaare sind in Kap. 5.1 dargestellt)  
→Endkonzentration von 10 pmol/µl (10µl Primerlösung + 90 µl Aqua inject.)

- DreamTaq Green PCR Master Mix (Fermentas)
  - DNA-Polymerase
  - dNTP-Mix
  - $\text{MgCl}_2$
  - Green-Puffer
- Multiplex PCR-Kit (Qiagen)
  - DNA-Polymerase
  - dNTP-Mix
  - Q-Solution
  - PCR-Puffer
- BigDye Termination Kit (Applied Biosystems)
- Aqua ad injectabilia
- DNA (gDNA, eingestellt auf 100 ng/  $\mu\text{l}$ )

**Aufreinigung der PCR-Produkte**

- Gel-Extraktion Kit (Qiagen)
- Isopropanol
- Ethanol 70 % (70 ml Ethanol 100 % + 30 ml Aqua dest.)
- Steriles Wasser (Braun)

**Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte**

- DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen)

**Kapillarelektrophorese**

- Hi-Di Formamid

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Patienten und Studienrahmenbedingungen**

#### **Auswahl der Patienten**

An der vorliegenden Studie nahmen 17 Familien mit insgesamt 44 Personen teil. Der überwiegende Teil der Patienten (neun Familien) gehörte zum Patientenkontingent der Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde und Kinderzahnheilkunde des Universitätsklinikums Jena. Fünf Familien wurden von einer Zahnarztpraxis in Norwegen, die übrigen drei Familien von in Deutschland niedergelassenen Zahnärzten an das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Jena überwiesen.

Im Vorfeld der Studie wurde vom überweisenden Zahnarzt eine Anamnese mit medizinisch-zahnbezogenen und familiären Daten erhoben und die Verdachtsdiagnose AI gestellt. Nach Evaluierung der Daten erfolgte durch das Institut für Humangenetik die humangenetische Beratung mit dem Erstellen von Stammbäumen. Mit deren Hilfe konnte ein erster Rückschluss auf den potentiellen Erbgang gezogen werden.

Den Patienten wurde mit dem im Anhang abgebildeten Aufklärungsbogen schriftlich die Möglichkeit zur Teilnahme an einer humangenetischen Untersuchung zur Verifizierung des Genotyps bei einer AI angeboten. In diesem Schreiben wurden die Patienten über das Ziel und die Methode der Studie informiert. Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie war das Vorliegen einer schriftlichen Einwilligungserklärung. Ein Fragebogen zur Aktualisierung und Erweiterung der Anamnese sowie der klinischen Befunde war ebenso im Vorfeld der Studie auszufüllen. Einwilligungserklärung und Anamnesebogen sind ebenfalls im Anhang abgebildet. Die Studie wurde vor Untersuchungsbeginn von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena geprüft und genehmigt.

#### **Einschlusskriterien**

Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war das Vorliegen von hypoplastischen und/oder hypomineralisierten Schmelzdefekten ohne weitere morphologische Veränderungen anderer Gewebe im Körper der betroffenen

Patienten. Die Veränderungen konnten lokalisiert oder systemisch auftreten und eine oder beide Dentitionen betreffen.

### **Datenerfassung**

Name und Adresse der Patienten, vorhandene Fotodokumentationen, die Familienanamnese und morphologische Zahnveränderungen mit Eingangsdiagnosen wurden nach Vorliegen der Einverständniserklärung in der Datenbank Pligu und in der Patientenakte registriert. Nach erfolgter molekulargenetischer Untersuchung wurde der Befund mit allen relevanten Informationen ergänzt.

#### **4.2.2 Molekulargenetische Untersuchung zum Nachweis krankheitsverursachender Mutationen in den Zielsequenzen der Kandidatengene**

Die molekulargenetische Untersuchung wurde in Form einer Stufendiagnostik durchgeführt. Zunächst erfolgte die Untersuchung auf Veränderungen im *Enamelin*-Gen. Erst im Falle eines unauffälligen Befundes wurden die sechs weiteren Gene analysiert. Alle untersuchten Gene wurden komplett sequenziert.

Konnte im ENAM-Gen eine Mutation in heterozygotem Zustand nachgewiesen werden, erfolgte im Anschluss, sofern möglich, die Untersuchung der Eltern um deren Heterozygotenstatus zu prüfen.

##### **4.2.2.1 Blutentnahme und DNA-Isolation**

Jedem Patienten wurde 9 ml venöses Vollblut in einem EDTA-Röhrchen entnommen. Es folgte die Isolierung der DNA aus diesen Proben und die Bestimmung der DNA-Konzentration. Die zu untersuchenden Abschnitte der genomischen DNA wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt.

##### **4.2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Das Prinzip der PCR beruht auf der enzymatischen In-vitro-Vermehrung definierter DNA-Sequenzen aus einer gesamten genomischen DNA heraus. Folgende drei Schritte sind essentiell:

1. Die genomische DNA wird bei 92 - 95° C denaturiert, d.h. aus dem DNA-Doppelstrang entstehen zwei Einzelstränge.

2. Zwei Oligonukleotid-Primer binden gegenläufig an den komplementären Stellen der zu amplifizierenden DNA-Region eines Stranges. Sie sind entsprechend der Basensequenz ausgewählt worden. Das Temperatur-optimum (Annealing) dieser Reaktion liegt je nach Länge und GC-Gehalt der Primer bei 35 - 70° C.
3. Nach Primer-Bindung erfolgt von ihnen aus, entsprechend der Basenabfolge des Einzelstrangs, unter Einsatz der hitzebeständigen Taq-Polymerase die Neusynthese des zweiten Strangs. Die optimale Arbeitstemperatur dieses Enzyms liegt bei 72° C.

Diese drei Schritte der DNA-Amplifikation werden in einem Thermocycler mehrmals hintereinander zyklisch vorgenommen. Dies führt zu einer nahezu exponentiellen Vermehrung der zwischen den Primern liegenden DNA.

#### **4.2.2.3 Gel-Elektrophorese**

Die amplifizierten PCR-Produkte können entsprechend ihrer Längen im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dazu wird ein Agarose-Gel hergestellt, wobei die Porengröße der Matrix durch die Agarosekonzentration bestimmt wird. Alle DNA-Moleküle besitzen eine negative elektrische Nettoladung und bewegen sich somit zur Anode. Kleine Fragmente bewegen sich deutlich schneller als größere. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist zudem von der angelegten Spannung abhängig. Durch einen mitgeführten Längenstandard können die aufgetrennten Produkte anhand ihrer Länge identifiziert werden.

#### **4.2.2.4 Sequenzierung**

Um Kenntnis über die genaue Basenabfolge und mögliche Veränderungen in den Genen zu erhalten, können diese mit Hilfe der Sequenzierung analysiert werden. In dieser Studie wurde die Methode nach Sanger angewendet, die auf der enzymatischen Neusynthese eines markierten, komplementären DNA-Einzelstrangs basiert. Die Neusynthese wird dabei basenspezifisch unterbrochen.

Der Ansatz beinhaltet neben der einsträngigen Matrizen-DNA, einem speziellen markierten Primer, einer Polymerase und den vier Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch deren Didesoxy-Varianten (ddNTPs), die mit den dNTPs um die

Bindungsstellen an der Matrizen-DNA konkurrieren und denen eine OH-Gruppe fehlt. Deshalb können an diese keine weiteren Nukleotide angelagert werden, was zum Kettenabbruch führt. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die mit der Base A, C, G oder T enden.

Anschließend werden die Proben kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet. Die Basensequenz kann in einem Chromatogramm abgelesen werden.

#### **4.2.2.5 PCR- und Elektrophoresebedingungen**

##### **Ermittlung der Primer-Annealing-Temperaturen**

Für die einzelnen Primerpaare wurde in einer Gradienten-PCR mit fünf Temperaturen je nach Schmelztemperatur des Primers bzw. je nach Literaturangaben diejenige Temperatur ermittelt, bei der möglichst viel PCR-Produkt gebildet und wobei keine zusätzlichen unspezifischen Produktbanden nachgewiesen werden konnten. Somit ergaben sich für die einzelnen Primerpaare spezifische Annealing-Temperaturen, die in unter 5.1 dargestellt sind. Die daraus resultierenden Gen-spezifischen PCR-Programme sind ebenfalls unter 5.1 gezeigt.

Pro Probe wurden 11,5 µl Mastermix und 1 µl genomische DNA einer gesunden Kontrollperson (Gesamtvolumen 12,5 µl) in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Ein amplifizierter Leerwert enthielt an Stelle von DNA 1 µl A. dest.

Der Mastermix setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

- 1,25 µl 10x Puffer
- 1,0 µl  $MgCl_2$
- 0,5 µl dNTPs
- 0,75 µl 10 nM Primer forward
- 0,75 µl 10 nM Primer reverse
- 7,25 µl A. dest.
- 0,25 µl Polymerase

##### **PCR**

Die initiale Denaturierung der ursprünglichen DNA-Doppelstränge und Primer wurde bei einer Temperatur von 95° C über 5 Minuten erreicht. Es folgten 35

Zyklen, jeweils beginnend mit der Denaturierung bei 95° C für 30 s, der anschließenden Anlagerung der Primer bei der jeweiligen spezifischen Annealing-Temperatur für 45 s und der DNA-Elongation, abhängig von der Länge der Amplikons, bei 72° C über 1-2 Minuten. Je nach Gen ergaben sich unterschiedliche PCR-Ansätze, die nachfolgend für jedes Gen dargestellt sind.

Die Zielsequenzen der Gene Enam, Amelx, DLX3, KLK4, MMP20 und WDR72 wurden mit dem DreamTaq Green PCR-Master Mix (Fermentas) amplifiziert, die GC-reichen Sequenzen des FAM83H-Gens mit dem Multiplex PCR-Kit (Qiagen). Um Verunreinigungen und unspezifische Amplifikationen auszuschließen, wurde pro Patient ein Leerwert (ohne DNA) mit amplifiziert.

Zunächst erfolgte die Herstellung eines Gesamt-Master Mix (GMM), dessen Volumen hälftig in einen Patienten-Master Mix (PMM) und einen Leerwert-Master Mix (LMM) aufgeteilt wurde. Dem PMM wurde anschließend pro Amplikon ein µl Template, dem LMM die entsprechende Menge Aqua dest. zupipetiert. Beide Mastermixe wurden dann wiederum aufgeteilt, die Anzahl der Portionen entsprach der Anzahl der Amplikons. Jeder Portion wurden abschließend die entsprechenden Primer (forward und reverse) zugefügt.

### Enamelin

Das ENAM-Gen umfasst zehn Exons, untersucht wurden 12 Zielsequenzen. Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für 12 Amplikons und die Leerwerte.

**Tab. 2: PCR-Ansatz für das ENAM-Gen**

Reagenzien	Volumina pro Amplikon	GMM für 26x	PMM mit 139,75 µl	LMM mit 139,75 µl
DT Green PCR Master Mix	6,25 µl	162,5 µl	---	---
Primer, forward	0,375 µl	---	---	---
Primer, reverse	0,375 µl	---	---	---
DANN	1 µl	---	13 µl	---
Aqua dest.	4,5 µl	117 µl	---	13 µl
Summe	12,5 µl	<b>279,5 µl</b>	<b>165</b>	<b>165</b>

PMM und LMM wurden in jeweils in 12 Portionen zu 11,75 µl aufgeteilt, jeder Portion wurden 0,75 µl Primermix zugefügt.



### **Amelogenin und KLK4**

Bei beiden Genen wurden sechs Zielsequenzen untersucht. Das AMELX-Gen umfasst sieben Exons, das KLK4-Gen zehn. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung der PCR-Ansätze für jeweils sechs Amplikons und die Leerwerte.

**Tab. 3: PCR-Ansatz jeweils für das AMELX-Gen und das KLK4-Gen**

Reagenzien	Volumina pro Amplikon	GMM für 14x	PMM mit 75 µl	LMM mit 75 µl
DT Green PCR Master Mix	6,25 µl	87,5 µl	---	---
Primer, forward	0,375 µl	---	---	---
Primer, reverse	0,375 µl	---	---	---
DANN	1 µl	---	6 µl	---
Aqua dest.	4,5 µl	63 µl	---	6 µl
Summe	12,5 µl	<b>150,5 µl</b>	<b>81 µl</b>	<b>81 µl</b>

PMM und LMM wurden jeweils in sechs Portionen zu 11,75 µl aufgeteilt, jeder Portion wurden 0,75 µl Primermix zugefügt.

### **DLX3**

Das DLX3-Gen umfasst drei Exons, untersucht wurden drei Zielsequenzen. Tabelle 4 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für drei Amplikons und die Leerwerte.

**Tab. 4: PCR-Ansatz für das DLX3-Gen**

Reagenzien	Volumina pro Amplikon	GMM für 7x	PMM mit 37 µl	LMM mit 37 µl
DT Green PCR Master Mix	6,25 µl	43,75 µl	---	---
Primer, forward	0,375 µl	---	---	---
Primer, reverse	0,375 µl	---	---	---
DANN	1 µl	---	3 µl	---
Aqua dest.	4,5 µl	31,5 µl	---	3 µl
Summe	12,5 µl	<b>75,25 µl</b>	<b>40 µl</b>	<b>40 µl</b>

PMM und LMM wurden in jeweils drei Portionen zu 11,75 µl aufgeteilt, jeder Portion wurden 0,75 µl Primermix zugefügt.

### **WDR72**

Das WDR72-Gen umfasst 21 Exons, es wurden 21 Zielsequenzen untersucht. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für 21 Amplikons und die Leerwerte.

**Tab. 5: PCR-Ansatz für das WDR72-Gen**

Reagenzien	Volumina pro Amplikon	GMM für 44x	PMM mit 236 µl	LMM mit 236 µl
DT Green PCR Master Mix	6,25 µl	275 µl	---	---
Primer, forward	0,375 µl	---	---	---
Primer, reverse	0,375 µl	---	---	---
DANN	1 µl	---	21 µl	---
Aqua dest.	4,5 µl	198 µl	---	21 µl
Summe	12,5 µl	<b>473 µl</b>	<b>257 µl</b>	<b>257 µl</b>

PMM und LMM wurden in jeweils 21 Portionen zu 11,75 µl aufgeteilt, jeder Portion wurden 0,75 µl Primermix zugefügt.

### **MMP20**

Das MMP20-Gen umfasst 10 Exons, es wurden 10 Zielsequenzen untersucht. Tabelle 6 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für 10 Amplikons und die Leerwerte.

**Tab. 6: PCR-Ansatz für das MMP20-Gen**

Reagenzien	Volumina pro Amplikon	GMM für 22x	PMM mit 118 µl	LMM mit 118 µl
DT Green PCR Master Mix	6,25 µl	137,5 µl	---	---
Primer, forward	0,375 µl	---	---	---
Primer, reverse	0,375 µl	---	---	---
DANN	1 µl	---	10 µl	---
Aqua dest.	4,5 µl	99 µl	---	10 µl
Summe	12,5 µl	<b>236,5 µl</b>	<b>128 µl</b>	<b>128 µl</b>

PMM und LMM wurden jeweils in 10 Portionen zu 11,75 µl aufgeteilt, jeder Portion wurden 0,75 µl Primermix zugefügt.

### **FAM83H**

Das FAM83H-Gen umfasst fünf Exons, es wurden 13 Zielsequenzen untersucht. Zusätzlich wurde ein Promotorbereich mit amplifiziert. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für 14 Amplikons und die Leerwerte.

**Tab. 7: PCR-Ansatz für das FAM83H-Gen**

Reagenzien	Volumina pro Amplikon	GMM für 30x	PMM mit 165 µl	LMM mit 165 µl
Puffer 10x	1,25 µl	37,5 µl	---	---
Q-Solution	2,5 µl	75 µl	---	---
dNTPs	1,25 µl	37,5 µl	---	---
Primer, forward	0,5 µl	---	---	---
Primer, reverse	0,5 µl	---	---	---
DANN	1 µl	---	14 µl	---
Polymerase	0,15 µl	4,5 µl	---	---
Aqua dest.	5,85 µl	175,5 µl	---	14 µl
Summe	12,5 µl	<b>330 µl</b>	<b>199 µl</b>	<b>199 µl</b>

PMM und LMM wurden jeweils in 14 Portionen zu 11,75 µl aufgeteilt, jeder Portion wurden 0,75 µl Primermix zugefügt.

### **Gel-Elektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit einem 1,5%igen Agarose-Gel (50 ml), welches 8 µl 2000x Gelstar enthielt. Nach vollständigem Erkalten der Agarose wurden die zwei 8er-Gelkämme entfernt, die Taschen gefüllt und das Gel aus der Gelwanne in die mit Puffer gefüllte Elektrophorese-Wanne überführt. In die erste Tasche links wurde der Größen-Längenstandard Marker puc8 (10 µl) gefüllt. Nachfolgend wurden die PCR-Produkte (Gesamtvolumen) aufgetragen, wobei zwischen den Amplikons eine Spur frei zu lassen war. Durch Aufsetzen des Deckels wurde der Kontakt zur Spannungsquelle hergestellt. Die angelegte Spannung betrug 100 V, die

Laufzeit ca. 30 Minuten. Im Anschluss wurden die Gele fotografiert, dabei so kurz wie möglich UV-Licht ausgesetzt, und beschriftet.

#### **4.2.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die Aufreinigung erfolgte unter Anwendung des Gel-Extraktion Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Zunächst wurden die PCR-Banden auf dem Blautisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Gelblöcke jeweils in ein beschriftetes Reaktionsgefäß gegeben und gewogen. Das Messergebnis wurde auf den Gefäßen vermerkt. Die Gelstücke wurden anschließend mit der dreifachen Menge QG-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 50° C inkubiert. Währenddessen wurden die Proben zwei- bis dreimal gevortext. Nachdem die Gelblöcke vollständig geschmolzen waren, wurde jede Probe mit dem einfachen Volumen Isopropanol versetzt und mehrfach invertiert. Anschließend wurden die Proben auf die beschrifteten Säulen geladen und bei 13.000 rpm für 60 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte das Waschen der Säulen. Dazu wurde den Proben zuerst jeweils 500 µl QG-Puffer zugefügt. Nach erneutem zentrifugieren bei 13.000 rpm für 60 und Verwerfen des Durchflusses wurden die Säulen mit 750 µl alkoholhaltigem PE-Puffer versetzt und 5 Minuten stehen gelassen. Nach anschließendem zweimaligen Zentrifugieren der Proben (13.000 rpm für 60 Sekunden) wurden die Säulen geöffnet 5 Minuten stehen gelassen, so dass der Restalkohol entweichen konnte. Abschließend erfolgte das Eluieren der Proben. Hierzu wurden die Säulen in beschriftete Reaktionsgefäße überführt, mit 30 µl sterilem Wasser versetzt und zentrifugiert (13.000 rpm für 60 Sekunden).

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Die Werte wurden dokumentiert.

#### **4.2.2.7 Sequenzierungs-PCR**

Für die Sequenzierreaktion wurden spezielle Sequenzierungsprimer verwendet, dargestellt unter Kap. 5.1. In Abhängigkeit von der Amplikongröße wurden definierte Mengen an PCR-Produkt eingesetzt, dargestellt in Tabelle 8.

**Tab. 8: Template-Menge für die Sequenzierungs-PCR**

Amplikongröße in bp	Eingesetzte Template-Menge in ng
100-200	1-3
200-500	3-10
500-1000	5-20
1000-2000	10-40
>2000	20-50

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

- 1 µl BigDye
- 1 µl 5x Sequenzierungspuffer
- 1 µl Primer
- PCR-Produkt
- A. dest. (ad. 10 µl)

Das Programm für die Sequenzierung-PCR ist in Tabelle 9 gezeigt.

**Tab. 9: PCR-Programm SEQUENZ**

Initiale Denaturierung	96° C/ 1 min
Zykluszahl	28
Denaturierung	96° C/ 10 sec
Annealing	55° C/ 8 sec
Extension	60° C/ 4 min
Store	10° C

#### 4.2.2.8 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Die Aufreinigung erfolgte unter Anwendung des Dye Ex 2.0 Spin Kits nach Herstellerangaben. Zunächst wurde das Säulenmaterial resuspendiert. Dazu wurde der Verschluss entfernt und jede Säule in ein 2 ml Collection Tube überführt. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 4.700 rpm für 3 Minuten wurden die Säulen in beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zum Sequenzierungsprodukt wurde je Probe 10 µl steriles Wasser gegeben, das Volumen dann auf die vorbereitete Säule pipettiert und bei 4.700 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das aufgereinigte Produkt wurde anschließend für ca. 20 Minuten in der Vakuumzentrifuge bei mittlerer Trocknungsrate ohne Heater getrocknet. Das

trockene Sequenzierungsprodukt wurde danach in 10 µl HiDi-Formamid aufgenommen und in die Sequenzerplatte überführt.

Der Lauf konnte mit dem Programm FastSeq POPZ, POPZ gestartet werden.

#### **4.2.2.9 Auswertung der Sequenzierung**

Nach erster Qualitätskontrolle mittels ABI Software Sequence Scanner erfolgte bei zufriedenstellendem Ergebnis mit entsprechender Peakhöhe, Sequenzsauerkeit und Leseweite der Datentransfer in den SeqPilot mit anschließender Auswertung.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Molekulargenetische Untersuchung zum Nachweis krankheitsverursachender Mutationen in den Kandidatengenen

#### Ermittlung der PCR-Bedingungen

Um für die verschiedenen Primerpaare die idealen PCR-Bedingungen zu ermitteln, wurden Vorversuche durchgeführt. Es erfolgte eine Temperaturgradienten-PCR, um die optimale Annealing-Temperatur zu ermitteln. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Temperatur, bei der eine einzelne kräftige Bande sichtbar war, wurde als Annealing-Temperatur gewählt. Die Tabellen 10 bis 23 zeigen die spezifischen Eigenschaften und Annealing-Temperaturen für die einzelnen Primerpaare sowie die genspezifischen PCR-Programme.

#### Enamelin

Tab. 10: Primer-Eigenschaften für das ENAM-Gen

Bereich	Oligoname Primer forward/ Sequenz (5'...3')	Oligoname Primer reverse/ Sequenz (5'...3')	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (° C)	Sequen- zierungs- Primer
E1	EnamE1F/ GAGACTTGACTT- GACAGCTCCTAT	EnamE1R/ TCTCTAATACTCAC- CCAATGCC	413	66	E1F
E1-3	EnamE1- CAAAGACAAGCTA ACAAAGTTCAA	EnamE1-3R/ GCCCTCTCAAGTG- TATTTCTGACA	735	64	E1-3F
E4-5	EnamE4-5F/ GCAGCTT- GAAAAGTACCA- GATGAT	EnamE4-5R/ ACTTTGCCTCGATT- TGAGAGTTTA	573	66	E4-5F
E6	EnamE6F/ CACTGGGAAGTT- CTAAGGTT	EnamE6R/ AACGGAGT- TATCTAG- ATAACAAG	212	62,9	E6R

E7	EnamE7F/ CAGCCTGAATCA- CAGCTCTATT	EnamE7R/ TTAAAAGGCAACAG TATTTGGGTA	513	64	E7F
E8	EnamE8F/ TTATCAT- TATCGTCTTT- GCCCTAT	EnamE8R/ CCCAGTTTCCCCAT- TACATT	567	64	E8F
E9	EnamE9F/ AATCATGTGGCT- GATAAGATTTC	EnamE9R/ CAAGCAAAGAAGTT CCACC	700	62	E9F
E10.1	EnamE10.1F/ AACACCATGGTGG- GGTGG- GAAACAAAG	EnamE10.1R/ TTACGTT- CCCAAGCAAAGAAG TTC	573	66	E10.1F
E10.2	EnamE10.2F/ ACAGAATAGGCCT TTTTACAGA	EnamE10.2R/ ATATGGGTTATATT- CAGGGTAGAA	787	63	E10.2F
E10.3	EnamE10.3F/ CAAGAAGAACATT- TACCCCATCCT	EnamE10.3R/ CATGCCATAGTTCA- AATTCTCACC	753	66	E10.3F
E10.4	EnamE10.4F/ AGCTGGGCTTCA- GAAAAATCCAAT	EnamE10.4R/ AGATGGTCTTT- GCTGTTGCCTCTC	709	66	E10.4F
E10.5	EnamE10.5F/ CTCCAATCCAGAA GGCATCCAA	EnamE10.5R/ CTCCAC- CTGGGTCGCTACTC CTAT	510	66	E10.5F

Tab. 11: PCR-Programm Enamelin-Gradient für das ENAM-Gen (Gradient 60-70° C)

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur	60,1	60,4	60,9	61,9	63	64,3	65,6	66,9	68,4	69,3	69,9	70,1
Amplikon				E9 E6	E10.2	E1-3 E7 E8	E1 E4-5 E10.1 E10.3 E10.4 E10.5					



**Amelogenin****Tab. 12: Primer-Eigenschaften für das AMELX-Gen**

Bereich	Oligoname Primer forward/ Sequenz (5'...3')	Oligoname Primer reverse/ Sequenz (5'...3')	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (° C)	Sequen- zierungs- Primer
E1	AmXE1F/ GAACTGAG- GAAAAGGCCGATG	AmXE1R/ TGTGAAAT- GTGCCAAGAAA	603	61,9	E1F
E2	AmXE2F/ TTCCCAACCTT- TAGAGCCAA	AmXE2R/ ATTTTGG- TAGCGGCATTTG	603	61,9	E2F
E3	AmXE3F/ TGTGTGCTGGTT- TCTGCTTC	AmXE3R/ CGGCCATATTTAG- GAGGACA	575	61,9	E3F
E4-5	AmXE4-5F/ AGGGACAGTGTT- TGCACCTC	AmXE4-5R/ CCAACCA- GAGAAGCAGCAGT	736	61,9	E4-5F
E6	AmXE6F/ AAGGCCACCGG- TATGTAGAC	AmXE6R/ ACTCTGGGGCCTAT TTTGCT	775	61,9	E6F
E7	AmXE7F/ TGAAGGTG- GAAGCAGTCCTC	AmXE7/ TTCCCTTCATTT- GGTTCAGG	630	61,9	E7F

**Tab. 13: PCR-Programm SPAST-Seq. (Gradient 55-65° C) für das AMELX-Gen**

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur	55,1	55,4	55,9	56,9	58	59,3	60,6	61,9	63,4	64,3	64,9	65,2
Amplikon								E1 E3 E4-5 E6 E7				

**DLX3****Tab. 14: Primer-Eigenschaften für das DLX3-Gen**

Bereich	Oligoname Primer forward/ Sequenz (5'...3')	Oligoname Primer reverse/ Sequenz (5'...3')	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (° C)	Sequenzierungs- Primer
E1	DLX3E1F/ CAAGACTT- GCAGCCAATCAG	DLX3E1R/ GGGAACCTT- CCAGTGTCTCC	499	61,9	E1F
E2	DLX3E2F/ AAGGCGTCGT- GAGCGAAG	DLX3E2R/ AAAGGCAAGAGTT- CCAGGAG	499	61,9	E2F
E3	DLX3E3F/ AAAGGCAAGAGT TCCAGGAG	DLX3E3R/ GCCTT- CTGCCTGGTCCTG	499	61,9	E3F

**Tab. 15: PCR-Programm SPAST-Seq. (Gradient 55-65° C) für das DLX3-Gen**

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur	55,1	55,4	55,9	56,9	58	59,3	60,6	61,9	63,4	64,3	64,9	65,2
Amplikon								E3				

**WDR72****Tab. 16: Primer-Eigenschaften für das WDR72-Gen**

Bereich	Oligoname Primer forward/ Sequenz (5'...3')	Oligoname Primer reverse/ Sequenz (5'...3')	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (° C)	Sequenzierungs- Primer
E2	WDR72 E2F/ AGCACTGGGAGA- ACACATCA	WDR72 E2R/ CCTTCCACTGT- CATTGCAGA	369	63,4	E2F
E3	WDR72 E3F/ TGTGGTGTTTTAA- TTCTTCAAACAG	WDR72 E3R/ AAAAAGGGAAG- GAAATGGAGA	220	59,3	E3F
E4	WDR72 E4F/ AAAGAAAACTTG GTGGCACA	WDR72 E4R/ TTTGCAAATGCC CTAAACAA	226	59,3	E4F

E5	WDR72 E5F/ GAGAAATCTT- CAATGTAGCCAAA	WDR72 E5R/ TTTCT- GAATTTCTGCC- CAAT	247	59,3	E5F
E6	WDR72 E6F/ TGAAATGATTTT- TACCTACCCAAT- TAT	WDR72 E6R TTTGAACTTT- GACAATAAACAT GTAA	247	59,3	E6F
E7	WDR72 E7F/ GGAAGCAGGTCTT CTCATGG	WDR72 E7R/ GACACATCATTC- CATTC- CATGTTCTGG	328	63,4	E7F
E8	WDR72 E8F/ ATATTCATCTTA- TTGGCAGACTA- GATT	WDR72 E8R/ AGCATGCAGG- GATTTTTCC	295	60,6	E8F
E9	WDR72 E9F/ AAAGTGG- GAGGGGGAAAAA	WDR72 E9R/ TTTTTCAAG- CCTGATTCTGT- GA	264	56,9	E9F
E10	WDR72 E10F/ GAAATGT- CAAAGAGTGG- GAAA	WDR72 E10R/ CTTGTTTGTGGT CCCATGCT	379	61,9	E10F
E11	WDR72 E11F/ GGGAGGGTGCCT TGATATTT	WDR72 E11R/ TCTGGTT- GAAATTGCAG- CTTTAGA	386	61,9	E11F
E12	WDR72 E12F/ AATCTTGG- GACGATTTTCTGA	WDR72 E12R/ TTG- GAAATATGGGT- CATTTTTACTT	380	60,6	E12F
E13	WDR72 E13F/ TGTAATGGGGCT TTAACAAAA	WDR72 E13R/ TCTGAACTTTC- GAACTTTC- CATCTGGTCA	386	60,6	E13F
E14	WDR72 E14F/ TCTGTCTTA- TTCTGTTGGGGTA	WDR72 E14R/ TTGGTA- GATGCAG-	390	59,3	E14F

	AA	CAGTCTCTT			
E15a	WDR72 E15aF/ CCTTTAG- CTGCTCTGCAATG	WDR72 E15aR/ GGC- TAGTGCCTCTGC TGAAA	379	62	E15aF
E15b	WDR72 E15bF/ GAGCACAGTG- GAGAAGAAGACA	WDR72 E15bR/ CCTGGCAACAT- CAGTGAGAA	384	62	E15bF
E15c	WDR72 E15cF/ GGGTCC- TATTTCTTTGG- GAAT	WDR72 E15cR/ AGGAAGGAATGT GAATGT- TAAAGAGCTAAA	400	62	E15cF
E16	WDR72 E16F/ TGGTCATGTACC- CATATCTTTGAT	WDR72 E16R/ AGAAAGAC- TAGTTA- TGTCCTTTCA- CAG	247	63,4	E16F
E17	WDR72 E17F/ ACAAAGCTTCC- CAGGTGATT	WDR72 E17R/ GGGGTATCCAT- GAACCACAG	246	60,6	E17F
E18	WDR72 E18F/ TTTTGCAACA- TACCCAAGCA	WDR72 E18R/ CGTT- CAGTTGCAC- CACCATA	347	60,6	E18F
E19	WDR72 E19F/ GGAAATGTTT- TAATGGTGTTTGC	WDR72 E19R/ ACCCCAAAG- CTGTGTCAAAT	245	60,6	E19F
E20	WDR72 E20F/ CTCCCCTCCTCTT GGTCTTT	WDR72 E20R/ AAACAAATGGCA TCTTTTGGA	199	60,6	E20F

Tab. 17: PCR-Programm SPAST-Seq. (Gradient 55-65° C) für das WDR72-Gen

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur	55,1	55,4	55,9	56,9	58	59,3	60,6	61,9	63,4	64,3	64,9	65,2
Amplikon						E3 E4 E6 E9 E14	E8 E12 E13 E17 E18 E19 E20	E10 E11 E15a E15b E15c	E2 E7 E16			

## MMP20

Tab. 18: Primer-Eigenschaften für das MMP20-Gen

Bereich	Oligoname Primer forward/ Sequenz (5'...3')	Oligoname Primer reverse/ Sequenz (5'...3')	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (° C)	Sequen- zierungs- Primer
E1	MMP20 E1F TACCCATCAT- CAGGGAGAG	MMP20 E1R CCAGACACCA- ATCTAGGTGGA	468	59,3	E1F
E2	MMP20 E2F CCCCAAACCAAT- CATCGTTA	MMP20 E2R GCCTGACG- GATGGATGTAAA	594	59,3	E2F
E3	MMP20 E3F TCCCTTTCATTT- GTCTTGTTGTT	MMP20 E3R ATGGCTTT- GCCATGGTCTT	482	59,3	E3F
E4	MMP20 E4F TTTTTCAAT- GGGCTGTTACTCA	MMP20 E4R CAACACAATTT- GGGGTGGAT	485	59,3	E4R
E5	MMP20 E5F CACCA- AAGCTAAGTGCCA GA	MMP20 E5R CAGCTCTTCA- CAAGAAGGCATA G	468	64,3	E5F

E6	MMP20 E6F GAAGCTGAGGCTT GAGGCTT- GCAAAGT	MMP20 E6R ACCACCCTT- CTGCTGCATAG	490	60,6	E6F
E7	MMP20 E7F AG- GCAAGGCAAGAG CAAAG	MMP20 E7R TAGGGTGGCATT TCATACCC	414	60,6	E7F
E8	MMP20 E8F ACTTTT- GCCTCCAGG- GAAGT	MMP20 E8R TCTG- TAAATCGCAC- CCCAGT	493	60,6	E8F
E9	MMP20 E9F TGGCACCA- CTACACTTCAGC	MMP20 E9R CAAACAAACAAA CAAAAACCTTCC	570	61,9	E9F
E10	MMP20 E10F GACAAGCTAACTG CCACCTGA	MMP20 E10R TGCAGAGTGCAT TGTGTTGA	484	64,3	E10F

Tab. 19: PCR-Programm SPAST-Seq. (Gradient 55-65° C) für das MMP20-Gen

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur	55,1	55,4	55,9	56,9	58	59,3	60,6	61,9	63,4	64,3	64,9	65,2
Amplikon							E6A	E9		E2 E5		E1 E3-4

**KLK4**

Tab. 20: Primer-Eigenschaften für das KLK4-Gen

Bereich	Oligoname Primer forward/ Sequenz (5'...3')	Oligoname Primer reverse/ Sequenz (5'...3')	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (° C)	Sequen- zierungs- Primer
E1	KLK4 E1F TGGAAGTTT- GCAGCACCTGA	KLK4 E1R GCGACATG- GAGCTGTAGG- GA	227	65,2	E1F
E2	KLK4 E2F CTCA-	KLK4E2R GCCATGGGG-	227	64,3	E2F

	TCCCCAGGTGCT GACGT	GACGGATAACA			
E3-4	KLK4E3-4F GCCCCAGCCCT GACTCG	KLK4E3-4R TCCGCACTGCAG CACGGTA	1196	65,2	E3-4F/ Seq.3-4.F1
E6A	KLK4 E6AF TAT- GTCGCTGGGCTAT GTTG	KLK4 E6AR GGCCTG- GACGGTTTTCTC	281	60,6	E6AF
E6B	KLK4 E6BF TGGCGTGCCAGG TGTCTA	KLK4 E6BR ATGGAAGGG- GAAGCAAGGAG	694	65,2	E6BF

Tab. 21: PCR-Programm SPAST-Seq. (Gradient 55-65° C) für das KLK4-Gen

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur	55,1	55,4	55,9	56,9	58	59,3	60,6	61,9	63,4	64,3	64,9	65,2
Amplikon				E1 E3 E4			E2 E6 E7 E8	E9		E5 E10		

**FAM83H**

Tab. 22: Primer-Eigenschaften für das FAM83H-Gen

Bereich	Oligoname Primer forward/ Sequenz (5'...3')	Oligoname Primer reverse/ Sequenz (5'...3')	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (° C)	Sequen- zierungs- Primer
Promo- tor	FAM83H Promotor F CGTCTGGTAT- GAGGCTT- GGTGTG	FAM83H Promotor R TCCGGCTCA- GTCGCTAG- GAAAC	696	59,3	Promotor F
E1	FAM83H E1F	FAM83H E1R	240	59,3	E1F

	CAGGAGGCAG- GAGCGAC	GGTAGCCCAAGT GGGACC			
E2	FAM83H E2F TCCACAGTGTGTC CATGCTC	FAM83H E2R GCTCAT- GCATCTCCTCCA C	617	59,3	E2F
E3	FAM83H E3F GTGATCCAGACAC CTCCCG	FAM83H E3R CCTGGTGTG- GAAAGGGG	527	59,3	E3R
E4	FAM83H E4F AGACCTCA- CATCCCTGCG	FAM83H E4R CTT- GAAGGCGTCCAT CTCC	588	59,3	E4F
E5_1	FAM83H E5_1F ACCTCA- CATCCCTGCGTCC TC	FAM83H E5_1R CGGGTCCCCT GGTACTGCT	748	64,3	E5_1F
E5_2	FAM83H E5_2F GTGTCGCGGCAG ACGTTCCCTC	FAM83H E5_2R GAGCGGAAT- GAGTCCTGCTTG G	725	60,6	E5_2F
E5_3	FAM83H E5_3F AGCAGGACTCA- TTCCGCTC	FAM83H E5_3R GACTCATTATG- GAGCACCTGG	610	60,6	E5_3F
E5_3a	FAM83H E5_3aF CGTTTGGCCTCC TACTTGAG	FAM83H E5_3aR GTCCAGCAGGC AGCTCT	633	60,6	E5_3aF
E5_4	FAM83H E5_4F GCCTGCCTT- CCCCTTCC	FAM83H E5_4R CTAGCTCGGGG CTGTTGTGGG	726	61,9	E5_4F
E5_5	FAM83H E5_5F GCCAACGCCTTG- TACAGCAGC	FAM83H E5_5R TGCTGAGGG- GAGAAAGGCACT G	709	64,3	E5_5F
E5_6	FAM83H E5_6F GAAGGGCCCAGA GAATGAGG	FAM83H E5_6R TCGCTGCCCG GTCATC	634	64,3	E5_6F
E5_7	FAM83H E5_7F ATGAATTTCA-	FAM83H E5_7R TTGGATT-	714	64,3	E5_7F



	CGAGGCTATCA-TCT	CTCCTGCTCGCT			
E5_8	FAM83H E5_8F GCCCCATTCTCA- GGTCCTTTCC	FAM83H E5_8R TCACAGGG- GAAATCTGG- GAGG	733	64,3	E5_8F

Tab. 23: PCR-Programm FAM-Gradient (Gradient 55-65° C) für das FAM83H-Gen

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur	55,1	55,4	55,9	56,9	58	59,3	60,6	61,9	63,4	64,3	64,9	65,2
Amplikon					(E1) E2 E3 E4		E5_1 E5_2 E5_3 E5_3a E5_6 E5_8	Prom.	E5_4 E5_5			

## 5.2 Morphologie, Anamnese, Stammbaumauswertung und molekulargenetische Untersuchung in 17 Familien mit klinischer Verdachtsdiagnose einer isolierten AI

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 32 Patienten auf Mutationen in den Kandidatengenen ENAM, AMELX, DLX3, KLK4, MMP20, FAM83H und WDR72 untersucht. Es konnten bereits beschriebene Veränderungen in den Genen ENAM und DLX3 als Ursache für das Vorliegen einer AI nachgewiesen werden. Im WDR72-Gen konnte mittels extern durchgeführter Exom-Sequenzierung eine pathogene Mutation detektiert werden, die bislang noch nicht im Zusammenhang mit einer AI beschrieben wurde. Die Erstellung der Stammbäume orientierte sich am Phänotyp. Männliche Merkmalsträger sind durch ein schwarzes Quadrat, weibliche Merkmalsträger durch einen schwarzen Kreis gekennzeichnet. Grau hinterlegte Symbole stehen für Patienten, die keine eindeutige klinische AI-Symptomatik zeigten und als unsicher betroffen charakterisiert wurden. Ein Pfeil markiert den oder die Indexpatienten, diese sind am stärksten betroffen.

### 5.2.1 Familien mit nachgewiesener Enamelin-Mutation

In 14 von 17 Familien konnte keine ENAM-Mutationen nachgewiesen werden. In Familie 1, 2 und 3 wurde bei vier betroffenen Patienten die gleiche *Frame-shift*-Mutation g. 13185\_13186insAG (c.1259\_1260insAG) als krankheitsverursachend in homozygotem oder heterozygotem Zustand nachgewiesen. Diese Mutation verursacht eine Veränderung des DNA-Leserasters mit Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons (p.P422fsX488; p.Pro422fs) und kann eine autosomal-dominante AI (ADAI) oder eine autosomal-rezessive AI (ARAI) bedingen (Ozdemir et al. 2005).

Die phänotypische Manifestation dieser Mutation ist gendosisabhängig: Der generalisierte hypoplastische Phänotyp mit offenem Biss segregiert als rezessives Merkmal und zeigt sich nur bei Homozygotie oder bei compound-heterozygoten ENAM-Veränderungen (Chan et al. 2010, Ozdemir et al. 2005, Hart et al. 2003). Lokal hypoplastische Defekte (Schmelzgrübchen oder -furchen), die im Zusammenhang mit dieser Mutation auftreten, sind ausschließlich bei heterozygoten Trägern beschrieben und werden als dominantes Merkmal vererbt.

#### Familie 1

Tab. 24: Studienteilnehmer Familie 1

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 1a	10 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 1b	41 Jahre	Gesund
Patient 1c	40 Jahre	Gesund

**Kommentar [A1]:** Prof. Heinrich-Weltzien bitte Alter der Eltern Günther ergänzen!!

Fotodokumentation:



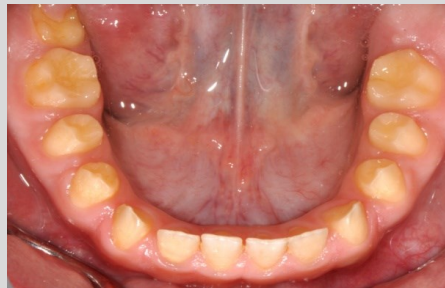
**Abb. 3: Patient 1a: Frontalansicht in statischer Okklusion**



**Abb. 4: Patient 1a: Frontalansicht Regio 12 bis 22 und 33 bis 42**



**Abb. 5: Patient 1a: OK-Übersichtsaufnahme**



**Abb. 6: Patient 1a: UK-Übersichtsaufnahme**



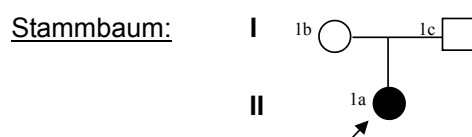
**Abb. 7: Patient 1a: Rechtes Seitenzahngebiet**



**Abb. 8: Patient 1a: Bissflügel-Aufnahme links**

Anamnese: Patient 1a ist als einziges Familienmitglied betroffen.

Klinischer Befund: generalisierte Hypoplasie aller vorhandener bleibender Zähne bei noch nicht erfolgtem Durchbruch der Molaren 17, 27 und 37; fehlende Approximalkontakte außer im Bereich 32/31; raue, zum Teil gelb verfärbte Zahnoberflächen; frontal offener Biss



Molekulargenetische Untersuchung:

Beim Indexpatienten 1a wurde die Mutation g.13185\_13186insAG in homozygotem Zustand nachgewiesen.

**Familie 2**

Tab. 25: Studienteilnehmer Familie 2

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 2	21 Jahre	Verdacht auf AI

Fotodokumentation:



Abb. 9 Patient 2: Frontalansicht



Abb. 10: Patient 2: OK-Übersichtsaufnahme



Abb. 11: Patient 2: UK-Übersichtsaufnahme



Abb. 12: Patient 2: Zahn 27

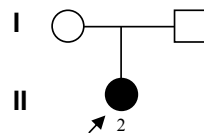
Anamnese:

Patient 2 ist das einzig betroffene Familienmitglied; der AI-Phänotyp zeigt sich in beiden Dentitionen, wobei das bleibende Gebiss stärker betroffen ist als das Milchgebiss; der Patient war zum Diagnosezeitpunkt unvollständig prothetisch versorgt (Keramikkronen auf 11-15, 21-25, 31-35 und 41-45); ein offener Biss liegt nicht vor.

**Kommentar [A2]:** Lag vor Versorgung ein offener Biss vor?

Klinischer Befund:

generalisierte hypoplastische AI aller Molaren (17 fehlt) mit konisch veränderter Kronenanatomie der OK-Molaren und fehlenden Approximalkontakten

Stammbaum:Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 2 wurde die Mutation g.13185\_13186insAG in homozygotem Zustand nachgewiesen.

### **Familie 3**

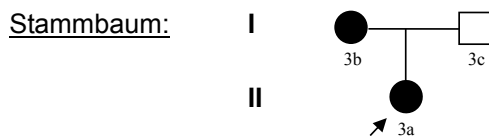
**Tab. 26: Studienteilnehmer Familie 3**

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 3a	4 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 3b	38 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 3c	36 Jahre	Gesund

Fotodokumentation: Es wurden keine Fotos erstellt.

Anamnese: Patient 3a ist am stärksten betroffen; Patient 3b zeigt deutlich mildere Zeichen einer AI

Klinischer Befund: Es lagen keine Informationen vor.



#### Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 3a und Patientin 3b wurde die Mutation g.13185\_13186insAG in heterozygotem Zustand nachgewiesen. In den weiteren untersuchten Bereichen des ENAM-Gens fanden sich keine Veränderungen. Die Untersuchung von Patient 3c ergab keine Veränderung im ENAM-Gen.

### **5.2.2 Familien mit nachgewiesener DLX3-Mutation**

In einer norwegischen Familie konnte bei zwei Patienten die DLX3-Mutation c.561\_562delCT in heterozygotem Zustand nachgewiesen werden. Diese Veränderung war als Mutation mit hoher Penetranz beschrieben, die sich regelmäßig durch hypoplastisch-hypomaturierte Schmelz und vergrößerte Pulpenkammern der Molaren auszeichnet. Weitere Gewebe sind nicht betroffen.

**Familie 4**

Tab. 27: Studienteilnehmer Familie 4

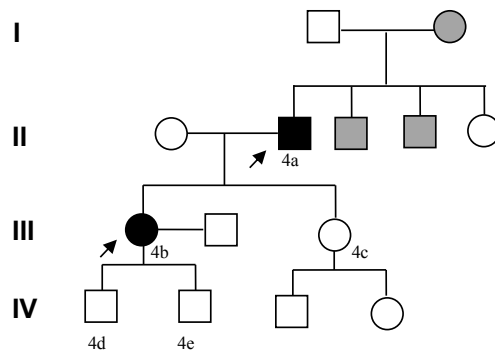
Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 4a	77 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 4b	35 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 4c	38 Jahre	Gesund
Patient 4d	10 Jahre	Gesund
Patient 4e	8 Jahre	Gesund

Fotodokumentation: Es wurden keine Fotos erstellt.

Anamnese: familiär bekannte DLX3-Mutation c.561\_562delCT

Klinischer Befund: Hypoplastischer Schmelz, es lagen keine genaueren Angaben vor.

Stammbaum:



Molekulargenetische Untersuchung:

Bei den Indexpatienten 4a und 4b konnte in der Homeodomäne des DLX3-Gens die Mutation c. 561\_562delCT in heterozygotem Zustand nachgewiesen werden. Auf dem anderen Allel konnte mit der hier durchgeführten Methode

keine Veränderung nachgewiesen werden. Bei den Patienten 4c, 4d und 4e konnte die familiäre bekannte Mutation nicht nachgewiesen werden.

### 5.2.3 Familien ohne nachgewiesene pathogene Mutation in den Kandidatengen

#### Familie 5

Tab. 28: Studienteilnehmer Familie 5

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 5a	13 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 5b	44 Jahre	Verdacht auf AI

#### Fotodokumentation:



Abb. 13: Patient 5a: Frontalansicht



Abb. 14: Patient 5a: Linkes Seitenzahngebiet



Abb. 15: Patient 5a: Rechtes Seitenzahngebiet



Abb. 16: Patient 5a: OK-Übersichtsaufnahme





Abb. 17: Patient 5a: UK-Übersichtsaufnahme



Abb. 18: Patient 5b: Frontalansicht



Abb. 19: Patient 5b: Linkes Seitenzahngebiet



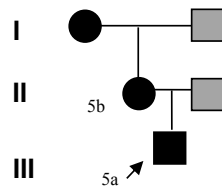
Abb. 20: Patient 5b: Rechtes Seitenzahngebiet

Anamnese: Patient 5a ist am stärksten betroffen, Mutter und Großmutter mütterlicherseits sind auch betroffen, von der Großmutter konnte kein Untersuchungsmaterial gewonnen werden.

Klinischer Befund: Patient 5a: generalisiert fluoroseartiger Phänotyp (weiß-opake Läsionen), bröckelige Konsistenz

Patient 5b: lokalisierte weiße Opazitäten an 21 sowie den OK-Prämolaren und ersten Molaren

Stammbaum:



Molekulargenetische Untersuchung:

Beim Indexpatienten 5a wurde keine Mutation in den Genen AMELX bzw. DLX3 und ENAM nachgewiesen. Somit erfolgte keine molekulargenetische Untersuchung von Patient 5b, der Mutter des Patienten.

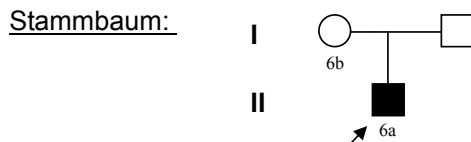
**Familie 6****Tab. 29: Studienteilnehmer Familie 6**

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 6a	12 Jahre	Verdacht auf hypoplastische AI
Patient 6b	41 Jahre	Gesund

Fotodokumentation:**Abb. 21: Patient 6a: Frontalansicht****Abb. 22: Patient 6a: Frontalansicht  
Regio 12 bis 22 und 32 bis 42****Abb. 23: Patient 6a: OK-Übersichtsaufnahme****Abb. 24: Patient 6a: UK-Übersichtsaufnahme**

Anamnese: Patient 6a ist ein Einzelfall in der Familie, die erste Dentition war nicht betroffen.

Klinischer Befund: Patient 6a: grübchenartiger hypoplastischer Phänotyp mit rauen Zahnoberflächen



Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 6a wurde in den Genen ENAM, AMELX, MMP20, KLK4 und DLX3 keine Mutationen nachgewiesen.

Im DLX3-Gen wurde an der Position c.582 der kodierenden Sequenz ein heterozygoter Austausch G>A detektiert. Nach Datenbankrecherche mittels Mutationstaster.org konnte dieser Austausch als nicht krankheitsverursachender SNP (*single nucleotide polymorphism*) klassifiziert werden. Gleiches gilt für den im AMELX-Gen an der Position g.1595, im intronischen Bereich gelegenen nachgewiesenen homozygoten Austausch T>C.

Weiterhin wurden im MMP20-Gen vier Veränderungen gefunden: In der 5' untranslatierten Region wurde an Position g.30838 ein heterozygoter Austausch von G>A nachgewiesen, der in der Mutationstaster-Datenbank als SNP vermerkt ist. Zusätzlich wurden drei heterozygote Veränderungen detektiert (Position c.53 A>C, K18T; Position c.824 T>C, V275A und Position c.842, T281N), die in einem Aminosäureaustausch resultieren, jedoch in der Datenbank dbSNP alle als wahrscheinlich nicht krankheitsverursachende Polymorphismen vermerkt sind.

Patient 6b wurde aufgrund des unauffälligen Befundes von Indexpatient 6a nicht molekulargenetisch untersucht.

**Familie 7**

Tab. 30: Studienteilnehmer Familie 7

Studienteilnehmer	Alter bei Studienbeginn	Klinische Eingangsdiagnose	Differentialdiagnosen
Patient 7a	19 Jahre	Verdacht auf AI vom Hypomaturationstyp	Dentalfluorose
Patient 7b	15 Jahre	Verdacht auf AI	Dentalfluorose, MIH
Patient 7c	44 Jahre	Gesund	
Patient 7d	43 Jahre	Gesund	

**Fotodokumentation:**

Abb. 25: Patient 7a: Frontalansicht

Abb. 26: Patient 7a: Frontalansicht  
Regio 12 bis 22 und 33 bis 43

Abb. 27: Patient 7a: OK-Übersichtsaufnahme



Abb. 28: Patient 7a: UK-Übersichtsaufnahme



**Abb. 29: Patient 7a: Rechtes Seitenzahngebiet**



**Abb. 30: Patient 7a: Linkes Seitenzahngebiet**



**Abb. 31: Patient 7b: Frontalansicht**



**Abb. 32: Patient 7b: Frontalansicht  
Regio 12 bis 23 und 33 bis 43**



**Abb. 33: Patient 7b: Frontalansicht  
Regio 11, 21 und 32 bis 42**



**Abb. 34: Patient 7b: OK-Übersichtsaufnahme**



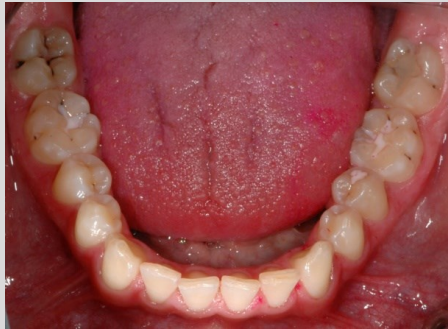


Abb. 35: Patient 7b: UK-Übersichtsaufnahme

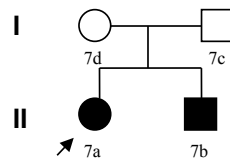
Anamnese: Patient 7a ist am stärksten betroffen.

Klinischer Befund:

Patient 7a: hypomaturierter, harter Zahnschmelz mit generalisierter abnormer Transparenz, charakterisiert durch fluoroseähnliche weiß-opake Opazitäten; Zahn 11 und 21: bogenförmige, bräunliche Verfärbung im mittleren vestibulären Kronendrittel mit Transluzenzunterschieden ober- und unterhalb dieser Linie

Patient 7b: harter Zahnschmelz mit weiß-opaken Opazitäten; Querrillen an OK- und UK-Front

Stammbaum:



Molekulargenetische Untersuchung:

Beim Indexpatienten 7a wurde im ENAM-Gen keine eindeutig pathogene Mutation nachgewiesen. Im Exon 10 des ENAM-Gens konnte jedoch ein heterozygoter Basenaustausch von c.1181 A>T detektiert werden, der in dem Aminosäureaustausch Y394F (p.Tyr394Lys) resultiert. Dieser Austausch wurde mittels MutationTaster (<http://neurocore.charite.de/MutationTaster>), Polyphen

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) und Sift ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_BLink\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html)) als nicht krankheitsverursachender Polymorphismus eingeschätzt.

### **Familie 8**

**Tab. 31: Studienteilnehmer Familie 8**

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 8a	18 Jahre	Verdacht auf hypokalzifizierte AI
Patient 8b	48 Jahre	Gesund
Patient 8c	50 Jahre	Gesund

### **Fotodokumentation:**



**Abb. 36: Patient 8a: Frontalansicht in statischer Okklusion**



**Abb. 37: Patient 8a: Frontalansicht Regio 12 bis 22**



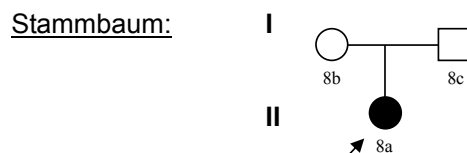
Abb. 38: Patient 8a: OK-Übersichtsaufnahme



Abb. 39: Patient 8a: UK-Übersichtsaufnahme

Anamnese: Patient 8a ist als Einziger in der Familie betroffen, Allelmerkmale zeigten sich nur im permanenten Gebiss.

Klinischer Befund: weiß-opake, raue Zahnoberflächen mit braunen Schmelzläsionen; käseartige, weiche Schmelzconsistenz



#### Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 8a wurde im ENAM-, AMELX-, MMP20-, KLK4- und DLX3-Gen keine Mutation nachgewiesen.

Im AMELX-Gen konnte an der Position c. 261 ein Austausch von C>T in heterozygotem Zustand detektiert werden. Ein weiterer heterozygoter Austausch A>C fand sich an der Position g.1331 (Intron). Beide Veränderungen wurden nach der Datenbankanalyse mittels Mutationstaster.org als wahrscheinlich nicht krankheitsrelevante Polymorphismen klassifiziert, wobei der Austausch c.261 C>T als SNP gelistet ist.

Im MMP20-Gen wurden vier heterozygote Veränderungen nachgewiesen, die alle als bekannte Polymorphismen in der Datenbank vermerkt sind: An den Positionen c.53 A>C, K18T und c.842 C>A, T281N befinden diese sich in



kodierenden Genbereichen. An den Positionen g.30783 C>T und 30838 G>A liegen die Veränderungen in intronischen Bereichen bzw. in der 5'-untranslatierten Region des Gens.

Eine molekulargenetische Untersuchung der Eltern erfolgte aufgrund des unauffälligen Befundes des Indexpatienten 8a nicht.

### **Familie 9**

**Tab. 32: Studienteilnehmer Familie 9**

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 9a	10 Jahre	Verdacht auf hypokalzifizierte AI mit offenem Biss
Patient 9b	8 Jahre	Verdacht auf lokalisierte AI
Patient 9c	11 Jahre	Gesund
Patient 9d	37 Jahre	Gesund
Patient 9e	48 Jahre	Gesund
Patient 9f	70 Jahre	Gesund
Patient 9g	22 Jahre	Gesund
Patient 9h	18 Jahre	Verdacht auf AI

### **Fotodokumentation:**



**Abb. 40: Patient 9a: Frontalansicht  
1. Dentition bei Erstvorstellung**



**Abb. 41: Patient 9a: OK-Übersichtsaufnahme  
1. Dentition bei Erstvorstellung**



**Abb. 42: Patient 9a: UK-Übersichtsaufnahme  
1. Dentition bei Erstvorstellung**



**Abb. 43: Patient 9a: Zahn 46 im Durchbruch**



**Abb. 44: Patient 9a: OK-Übersichtsaufnahme  
2. Dentition**



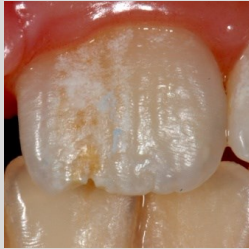
**Abb. 45: Patient 9a: UK-Übersichtsaufnahme  
2. Dentition**



**Abb. 46: Patient 9b: Frontalansicht  
Regio 12 bis 22 und 33 bis 43**



**Abb. 47: Patient 9b: Frontalansicht  
Regio 11**



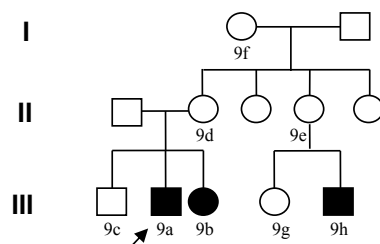
**Abb. 48: Patient 9b: Frontalansicht  
Regio 21**

Anamnese: Patient 9a war bei der Erstvorstellung 3 Jahre alt; neben dem Verdacht auf hypokalzifizierte AI mit offenem Biss wurden zu diesem Zeitpunkt eine Early Childhood Caries Typ II (ECC II), eine UK-Rücklage, ein Kreuzbiss sowie eine Zungenfehlfunktion diagnostiziert; der Patient wurde konservierend rehabilitiert und kieferorthopädisch behandelt; auch die 2. Dentition war generalisiert betroffen; bei Patient 9b lag eine lokalisierte AI der bleibenden Frontzähne vor, die 1. Dentition war nicht betroffen.

Klinischer Befund:

Patient 9a: generalisierter hypoplastischer Phänotyp beider Dentitionen; im Milchgebiss ausgeprägte Hypoplasie mit geringem Restzahnschmelz und Verlust der physiologischen Kronenanatomie; im bleibenden Gebiss weiß-opake, raue Zahnoberflächen mit orange-braunen Verfärbungen, stark reduzierte okklusale Schmelzschicht an den Prämolaren und 2. Molaren infolge Attrition

Patient 9b: Strukturstörung der bleibenden Inzisivi, besonders ausgeprägt an 11 und 21 in Form von Hypoplasie und vestibulären Rillen

Stammbaum:Molekulargenetische Untersuchung:

Beim Indexpatienten 9a wurde im ENAM-Gen keine Mutation nachgewiesen. Die Untersuchung des AMELX-Gens ergab keine eindeutig pathogene Mutation, in Exon 6 wurde jedoch an Position c.241 ein heterozygoter Austausch von C>T nachgewiesen, der zum Aminosäureaustausch P81S führt. Diese Veränderung ist nicht als SNP bekannt, eine Analyse mittels MutationTaster ([www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org)), Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) und SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) ergab, dass es sich um eine nicht krankheitsverursachende Variante bzw. einen tolerablen Austausch handelt.

Bei Patient 9b wurde ebenfalls die bei Patient 9a beschriebene Veränderung nachgewiesen.

Familie 10

Tab. 33: Studienteilnehmer Familie 10

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 6a	25 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 6b	20 Jahre	Verdacht auf AI

Fotodokumentation:



**Abb. 49: Patient 10a: Statische Okklusion von links**



**Abb. 50: Patient 10a: Statische Okklusion von rechts**



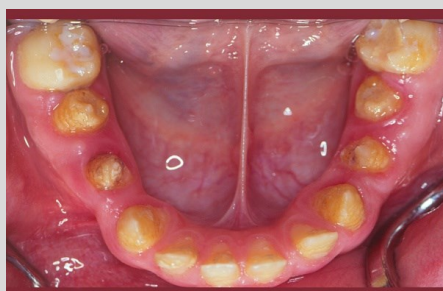
**Abb. 51: Patient 10a: Zähne 41-45**



**Abb. 52: Patient 10b: Frontalansicht in statischer Okklusion**



**Abb. 53: Patient 10b: OK-Übersichtsaufnahme**



**Abb. 54: Patient 10b: UK-Übersichtsaufnahme**



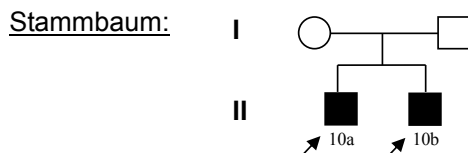
Abb. 55: Patient 10a: OPG



Abb. 56: Patient 10b: OPG

**Anamnese:** Beide Patienten zeigten ausgeprägte, generalisierte klinische Zeichen einer AI mit Hypersensibilität der zum Teil konisch geformten Zähne und einen offenen Biss; bei beiden Patienten lag ein verzögerter Zahndurchbruch mit multipel retinierten oder teilretinierten permanenten Zähnen vor.

**Klinischer Befund:** Patient 10a und Patient 10b: generalisierter stark hypoplastischer, bernsteinfarbener Phänotyp mit dünner Zahnschmelzschicht und weiten Approximarräumen



#### Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 10a und 10b wurde keine Mutation im ENAM-Gen nachgewiesen. Bei Patient 10b wurde keine pathogene Mutation im AMELX-Gen nachgewiesen. In Exon 6 dieses Gens wurde an Position c.241 ein hemizygoter Austausch von C>T detektiert, der zum Aminosäureaustausch P81S führt. Diese Veränderung ist nicht als SNP bekannt. Jedoch ergab eine Analyse mittels MutationTaster ([www. Mutationtaster.org](http://www.Mutationtaster.org)), Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) und Sift (<http://sift.jcvi.org/>), dass es sich um eine nicht krankheitsverursachende Variante bzw. einen tolerablen Austausch handelt.

**Familie 11**

Tab. 34: Studienteilnehmer Familie 11

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 11	20 Jahre	Verdacht auf AI

**Fotodokumentation:**

Abb. 57: Patient 11: Frontalansicht



Abb. 58: Patient 11: OK-Übersichtsaufnahme



Abb. 59: Patient 11: UK-Übersichtsaufnahme



Abb. 60: Patient 11: Rechtes Seitenzahngebiet

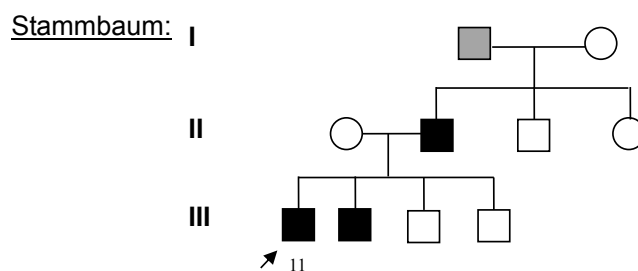




Abb. 61: Patient 11: Linkes Seitenzahngebiet

Anamnese: Es lagen keine anamnestischen Daten vor.

Klinischer Befund: generalisierte weiß-opake Opazitäten des inzisalen bzw. okklusalen Kronendrittels



Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 11 wurde keine Mutation im ENAM-Gen nachgewiesen.

## Familie 12

Tab. 35: Studienteilnehmer Familie 12

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 12a	64 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 12b	75 Jahre	Verdacht auf AI

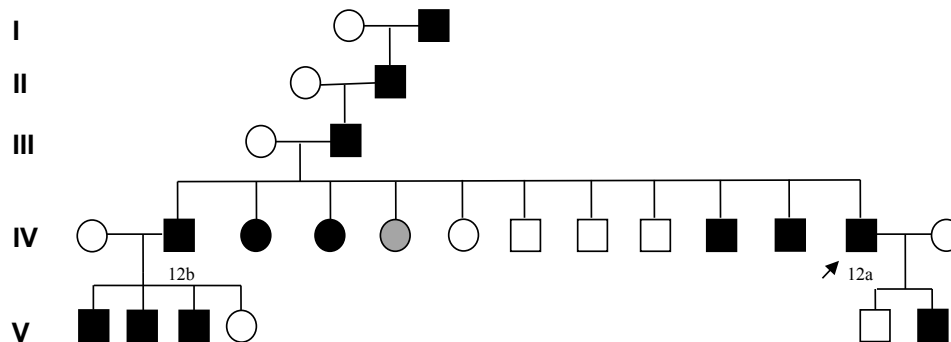
Fotodokumentation: Es wurden keine Fotos erstellt, da der Indexpatient 12a zum Studienzeitpunkt prothetisch komplett versorgt war.



Anamnese: Es lagen keine anamnestischen Daten vor.

Klinischer Befund: Es lag keine Beschreibung des Phänotyps vor.

Stammbaum:



Molekulargenetische Untersuchung:

Beim Indexpatienten 12a wurde keine Mutation im ENAM-Gen nachgewiesen, somit erfolgte keine molekulargenetische Untersuchung von Patient 12b.

### **Familie 13**

Tab. 36: Studienteilnehmer Familie 13

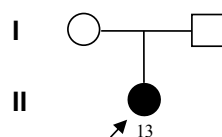
Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 13	28 Jahre	Verdacht auf AI

Fotodokumentation: Es wurden keine Fotos erstellt.

Anamnese: Es lagen keine Angaben vor.

Klinischer Befund: Es lagen keine Angaben vor.

Stammbaum:



Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 13 wurde keine Mutation im ENAM-Gen nachgewiesen. In Exon 1 wurde ein heterozygoter Austausch von G→A (NG\_013024.1:g.5159G→A) nachgewiesen, der in der Datenbank als SNP vermerkt ist.

**Familie 14****Tab. 37: Studienteilnehmer Familie 14**

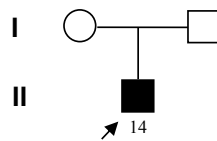
Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 14	41 Jahre	Verdacht auf AI

Fotodokumentation:**Abb. 62: Patient 14: Frontalansicht**

Anamnese: Es lagen keine anamnestischen Daten vor.

Klinischer Befund:

Zahn 11 bis 23: bräunliche, horizontal verlaufende linienartige Verfärbung im mittleren Kronendrittel: Unterhalb dieser erscheint der Schmelz opaker als im cervikalen, transluzenterem Kronendrittel;  
OK: multiple opak-weiße bis bräunliche Schmelzverfärbungen, zum Teil in Folge unversorgter kariöser Läsionen an den vestibulären Flächen von 13, 16, 22 und 23

Stammbaum:Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 14 wurde keine Mutation im ENAM-Gen nachgewiesen.

**Familie 15**

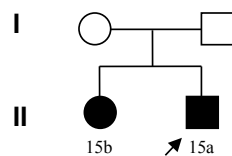
Tab. 38: Studienteilnehmer Familie 15

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 15a	10 Jahre	Verdacht auf AI Typ III B
Patient 15b	9 Jahre	Verdacht auf AI

Fotodokumentation: Es wurden keine Fotos erstellt.

Anamnese: Es lagen keine anamnestischen Daten vor.

Klinischer Befund: Es lagen keine Angaben vor.

Stammbaum:Molekulargenetische Untersuchung:

Beim Indexpatienten 15a konnte im ENAM-Gen keine Mutation nachgewiesen werden. Somit erfolgte keine molekulargenetische Untersuchung von Patient 15b.

**Familie 16**

Tab. 39: Studienteilnehmer Familie 16

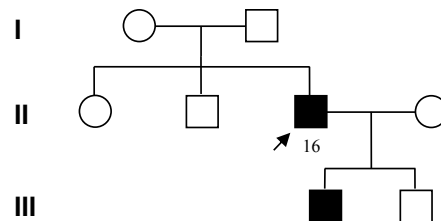
Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 16	44 Jahre	Verdacht auf AI

Fotodokumentation: Es wurden keine Fotos erstellt.

Anamnese: Bei Patient 16 zeigten sich Merkmale einer AI nur im permanenten Gebiss, beim Sohn des Patienten hingegen nur im Milchgebiss; der Sohn nahm an der Studie nicht teil.

Klinischer Befund: Es lagen keine Angaben vor.

Stammbaum:



Molekulargenetische Untersuchung:

Bei Patient 16 wurde keine Mutation im ENAM-Gen nachgewiesen.

**5.2.4 Familien mit nachgewiesener WDR72-Mutation**

In einer türkischen konsanguinen Familie konnte mittels extern durchgeführter Exom-Sequenzierung eine bislang unbekannte Mutation im WDR72-Gen als krankheitsverursachend detektiert werden. Der Phänotyp der homozygoten Mutationsträger war mit dem Phänotyp der bisher bekannten WDR72-Mutationen konsistent. Die heterozygoten Mutationsträger zeigten keine klinischen Merkmale.

**Familie 17**

Tab. 40: Studienteilnehmer Familie 17

Studienteilnehmer	Alter zum Studienzeitpunkt	Klinische Eingangsdiagnose
Patient 17a	13 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 17b	10 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 17c	16 Jahre	Verdacht auf AI
Patient 17d	44 Jahre	Gesund
Patient 17e	38 Jahre	Gesund

**Fotodokumentation:**Abb. 63: Patient 17a: Frontalansicht  
in statischer Okklusion

Abb. 64: Patient 17a: UK-Übersichtsaufnahme



Abb.65: Patient 17a: OK-Übersichtsaufnahme

Abb.66: Patient 17a: Statische Okklusion  
von rechts



**Abb.67: Patient 17a: Statische Okklusion von links**



**Abb.68: Patient 17b: Frontalansicht in statischer Okklusion**



**Abb.69: Patient 17b: UK-Übersichtsaufnahme**



**Abb. 70: Patient 17b: OK-Übersichtsaufnahme**



**Abb. 71: Patient 17b: Statische Okklusion von rechts**



**Abb. 72: Patient 17b: Statische Okklusion von links**



**Abb. 73: Patient 17c: Frontalansicht in statischer Okklusion**



**Abb. 74: Patient 17c: UK-Übersichtsaufnahme**



**Abb. 75: Patient 17c: OK-Übersichtsaufnahme**



**Abb. 76: Patient 17c: Statische Okklusion von rechts**

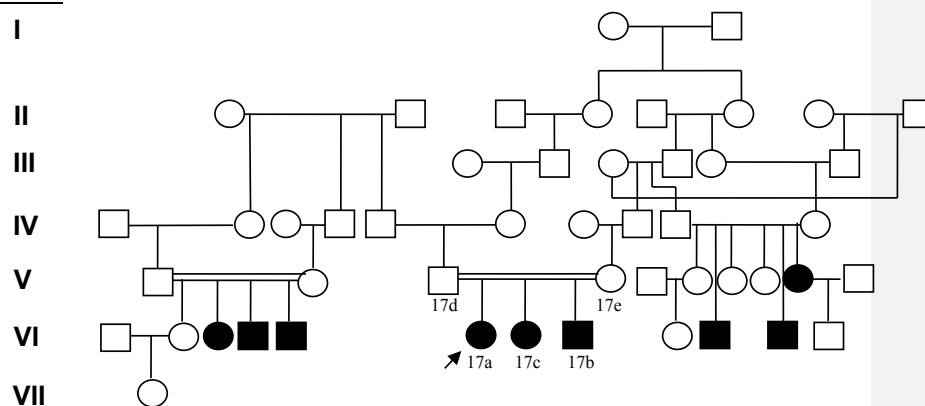


**Abb. 77: Patient 17c: Statische Okklusion von links**

Anamnese: Patient 17a ist am stärksten betroffen.

Klinischer Befund: Patient 17a, 17b, 17c: generalisierter ausgeprägter hypomaturierter, bernsteinfarbener Phänotyp mit dünner bzw. fehlender Schmelzschicht und pathologischer Kronenanatomie (v.a. der Seitenzähne);  
Patient 17a und 17c: frontal und seitlich offener Biss

Stammbaum:



Molekulargenetische Untersuchung:

Beim Indexpatienten 17a wurde im ENAM-Gen keine Mutation nachgewiesen. Bei den Patienten 17a, 17b und 17c konnte im WDR72-Gen eine ca. 103 kb große Deletion der Exons 13-18 in homozygoter Ausprägung nachgewiesen werden. Diese Mutation ist, obwohl sie bislang noch nicht im Zusammenhang mit AI beschrieben wurde, zweifellos als pathogen einzuschätzen. Diese Veränderung konnte bei den Eltern, Patient 17d und 17e, in heterozygoter Ausprägung ebenso detektiert werden.



## 6 Diskussion

Anstoß für die vorliegende Studie war die Tatsache, dass für Patienten mit Schmelzbildungsstörungen zu Studienbeginn im Jahre 2009 kein molekulargenetisch-diagnostisches Verfahren zur Verfügung stand, das die klinische Verdachtsdiagnose „Amelogenesis imperfecta“ sicher bestätigen konnte.

Daher sollte ein molekulargenetisches Verfahren entwickelt werden, das unter Berücksichtigung des Phänotyps und der Mutationshäufigkeit der einzelnen Gene so effizient wie möglich zu einer gesicherten Diagnose führt.

### 6.1 Auswirkungen der Enamelin-Mutation g.13185\_13186insAG

#### 6.1.1 Pathologisches Potential der Mutation

So wie die spezifische Rolle des Enzyms Enamelin in der Amelogenese noch weitgehend unbekannt ist, so ist auch der Pathomechanismus über den ENAM-Mutationen zu Schmelzstörungen führen noch nicht genau verstanden (Wright 2007).

ENAM-Mutationen führen zu einer hypoplastischen Schmelzbildung (Gutierrez et al. 2012). Ausprägung und Schwere der Defekte sind jedoch sehr variabel, So können Träger der gleichen Mutation stark differierende Phänotypen aufweisen (Kim et al. 2005).

Die autosomal-dominante ENAM-assoziierte AI wird in der Literatur als die am häufigsten vorkommende Form in Europa und Nordamerika beschrieben (Bece-rik et al. 2009, Gutierrez et al. 2012, Urzua et al. 2011, Hart et al. 2003, Lindemeyer et al. 2010). Mit ihr sind zwei klinische Erscheinungsbilder assoziiert. Beim generalisierten hypoplastischen Phänotyp imponiert eine reduzierte Dicke der kompletten Schmelzschicht. Diese besitzt oft eine raue, körnige Oberfläche. Im Gegensatz dazu sind bei der lokalen hypoplastischen Form umschriebene Schmelzgrübchen oder horizontale Furchenbanden, die die gesamte Zahnkrone auf gleicher Höhe umfassen, dominierend (Wright 2007, Ozdemir et al. 2005, Lindemeyer et al. 2010).

Der zugrunde liegende Pathomechanismus wird im Falle der lokalen hypoplastischen AI in Haploinsuffizienz vermutet, wobei das krankmachende,

hypomorphe Allel dominant vererbt wird (Wright 2007, Hart et al 2003). Mutationen, die diese Form bedingen, führen über ein vorzeitiges Stopp-Codon zu einem Abbruch der Proteinproduktion und einem verkürzten Genprodukt mit reduzierter oder fehlender Funktion. Diese sog. Funktionsverlustmutationen erzeugen zwar in der Regel rezessive Phänotypen, bei einigen resultiert jedoch die Reduzierung der Genprodukt-dosis um 50 % in phänotypischen Veränderungen. Obwohl ein homozygoter Funktionsverlust im Allgemeinen schwerere Merkmale verursacht, ist der heterozygote Phänotyp dennoch als dominant zu bezeichnen (Strachan und Read 1996). Eine Störung der Schmelzkristalliten-stehung und des Kristalllängenwachstums scheinen durch den Verlust des Enamelin-C-Terminus die Folge zu sein (Kang et al. 2009).

Im Gegensatz zur lokalen Form sieht Wright (2007) die Ursache für die meist schwere, generalisierte hypoplastische Form im sog. dominant-negativen Effekt. Hierbei behindert das in seiner eigenen Funktion veränderte Genprodukt zusätzlich noch die Funktion des Genprodukts des normalen Allels. Dies führt zu einer generalisierten dünnen Schmelzbildung (Wright 2007, Urzua et al. 2011). Dominant-negative Effekte sind auch bei Mutationen in Kollagen-kodierenden Genen bei der Osteogenesis imperfecta beschrieben (Siegenthaler und Blum 2006).

Die in dieser Studie mehrfach nachgewiesene Funktionsverlustmutation g.13185\_13186insAG (c.1258\_1259insAG) kann sowohl eine autosomal-dominante (ADAI) als auch eine autosomal-rezessive AI (ARAI) verursachen. Beide Formen sind, durch Dosiseffekte des ENAM-Gens bedingt, mit unterschiedlichen Phänotypen assoziiert. Bei heterozygoter Trägerschaft bildet sich ein im Vergleich zu homozygoten Trägern schwächerer Phänotyp aus, der aber dennoch als dominant zu bezeichnen ist. Wie oben erläutert, können Funktionsverlustmutationen, die normalerweise rezessive Phänotypen erzeugen, durch eine Haploinsuffizienz oder dominant-negativen Effekt einen dominanten Phänotyp hervorbringen. Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine Insertion der beiden Nukleotide A und G an der Position 13185 im Exon 10 des ENAM-Gens. Dies führt zu einer Veränderung des DNA-Leserasters (= *Frameshift*) mit modifizierten Enamelin-Spaltprodukten (Lindemeyer et al. 2010, Urzua et al. 2011, Hart et al. 2003). Die Mutation bewirkt einen Austausch des Codons für die Aminosäure L420 von CTG zu CTA, welches immer noch Leucin kodiert.

Die zusätzlichen Nucleotide führen jedoch zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese - 721 Aminosäuren (AS) werden vom C-Terminus entfernt. Das chimäre Protein besteht somit im Gegensatz zum Wildtyp-Protein mit 1142 AS nur noch aus 447 AS: 421 normalen, N-terminalen AS folgen 26 ausgetauschte AS und ein frühzeitiges Stopp-Codon an Position 448 (p.P422fsX448) (Hart et al. 2003, Lindemeyer et al. 2010, Chan et al. 2010).

Neben dieser, bereits mehrfach bei Patienten mit AI beschriebenen Mutation, kann noch eine zweite Veränderung im ENAM-Gen sowohl eine ADAI als auch eine ARAI verursachen (Hart et al. 2003, Pavlic et al. 2007, Lindemeyer et al. 2010, Chan et al. 2010, Ozdemir et al. 2005, Kang et al. 2009). Diese Mutation (g.12946\_12947insAGTCAGTACCAGTACTGTGTC, c.1020\_1021insAGTCAGTACCAGTACTGTGTC, p.V340\_M341insSQYQYCV) ist ebenfalls eine *Frameshift*-Mutation in Exon 10. Alle anderen bislang bekannten ENAM-Mutationen werden ausschließlich dominant vererbt (Urzua et al. 2011, Ozdemir et al. 2005).

### 6.1.2 Phänotypische Vielfalt der Mutation

Mit der Mutation g.13185\_1386insAG sind verschiedene Phänotypen assoziiert. Die Manifestation der klinischen Merkmale ist gendosisabhängig (Ozdemir et al. 2005, Hart et al. 2003). Loci, bei denen eine Verminderung der Aktivität um 50 % phänotypische Auswirkungen hat, sind gendosisempfindlich (Strachan und Read 1996). Bei heterozygoter Trägerschaft kommt es, im Gegensatz zu den anderen in der Literatur beschriebenen autosomal-dominant vererbten ENAM-Mutationen, nicht zur Ausprägung des kompletten AI-Phänotyps. Eine dosisabhängige Zunahme der phänotypischen Manifestationsstärke ist auch bei anderen Mutationen, z.B. bei familiärer Hypercholesterinämie, bekannt. (Hart et al. 2003).

Heterozygote Träger dieser Mutation zeigen eine lokale hypoplastische AI mit variabler Expression. Am häufigsten sind lokalisierte, umschriebene hypoplastische Schmelzdefekte (*localised circumscribed hypoplastic enamel defects* = LHED) in Form von Schmelzgrübchen (*enamel pitting*) unterschiedlicher Anzahl und Manifestationsstärke an den Labialflächen der Inzisiven und Okklusalfächen der Molaren sowie an der Eckzahnspitze (Hart et al. 2003, Chan et al. 2010). Hierbei sind Fälle von sehr milder Ausprägung bekannt (Ozdemir et al.

2005, Lindemeyer et al. 2010, Hart et al. 2003). Die Defekte waren zum Teil so gering, dass sie ursprünglich nicht mit AI assoziiert wurden. Erst jüngere genetische Analysen zeigten, dass auch dieser subklinische Phänotyp durch ein defektes ENAM-Allel verursacht wird (Chan et al. 2010, Kim et al. 2005, Hart et al. 2003). Chan et al. (2010) propagieren daraufhin die Subsumierung aller, auch noch so gering ausgeprägter vererbter Schmelzdefekte, unter der Bezeichnung „Amelogenesis imperfecta“. Andererseits zeigte die Analyse heterozygoter Träger dieser Mutation neben der oben beschriebenen Grübchenbildung auch Phänotypen, die vorrangig durch kreideartig-weiß verfärbten Schmelz mit milden hypoplastischen Veränderungen gekennzeichnet waren. Ebenso sind horizontale Furchenbanden im Sinne der unter 6.1.1 beschriebenen lokalen hypoplastischen Form mit dieser Veränderung assoziiert (Chan et al. 2010, Pavlic et al. 2007). Neben einer variablen Expression führt bei dieser Mutation auch eine unvollständige Penetranz zu einer Abweichung vom klassischen Vererbungsmuster. So zeigen einige heterozygote Träger keine nachweisbaren Schmelzdysplasien (Chan et al. 2010, Kang et al. 2009).

Der Phänotyp homozygoter Patienten ist in seinem Erscheinungsbild weniger variabel und manifestiert sich als generalisierte hypoplastische AI. Die Mutation g.13185\_13186insAG segregiert diese AI-Form als rezessives Merkmal (Ozdemir et al. 2005, Hart et al. 2003, Pavlic et al. 2007). Die Hypoplasie umfasst immer die gesamte Schmelzdicke und kann in schweren Fällen als Schmelzagenesie imponieren und mit dunkel verfärbten, gelb-braunen Zähnen einhergehen (Kang et al. 2009). Sind Schmelzareale nachweisbar, so sind diese röntgenologisch nicht vom Dentin zu unterscheiden (Pavlic et al. 2007, Hart et al. 2003). Viele dieser Patienten zeigten neben der generalisierten Hypoplasie noch ein weiteres Merkmal. So zeichnet der homozygote Zustand dieser Mutation wohl auch verantwortlich für das Auftreten eines frontal offenen Bisses. (Kang et al. 2009, Hart et al. 2003).

Ein frontal offener Biss ist gekennzeichnet durch fehlenden Kontakt der Frontzähne mit mehr oder weniger stark ausgeprägter vertikaler Distanz der inzisalen Kanten. Je nachdem, ob die Störung den dento-alveolären Bereich betrifft, oder ob eine Deformierung der Kieferkörper vorliegt, wird morphologisch zwischen dem alveolär oder dental offenen Biss und dem gnathisch oder skelettal offenen Biss unterschieden. In der Literatur herrscht keine Einigkeit darüber, worauf die

Koexistenz von AI und offenem Biss sowie dessen Ursache zurückzuführen ist. Einerseits werden pleiotrope Einflüsse der AI-Gene auf die kraniofaziale Entwicklung diskutiert und andererseits wird ein Zusammenhang zu modifizierenden Genen oder Umweltfaktoren für möglich gehalten (Gutierrez et al. 2012, Hart et al. 2003). Kephalometrische Analysen von AI-Patienten mit frontal offenem Biss ergaben einen Anstieg der vertikalen Parameter, was für eine vertikale Wachstumsrichtung mit Entwicklung eines skelettal offenen Bisses spricht (Hart et al. 2003, Gutierrez et al. 2012). Andere Autoren sehen die Ursache nicht in einer skelettalen Fehlentwicklung. Witkop führt das Auftreten auf habituelle Einflüsse zurück. Zungenpressen aufgrund temperaturempfindlicher Zähne stimuliert das Wachstum alveolärer Strukturen mit Ausbildung eines dental offenen Bisses (Hart et al. 2003).

Nach Auswertung weiterer Untersuchungen kann jedoch nicht verallgemeinernd gesagt werden, dass ein frontal offener Biss immer ein dominantes Merkmal homozygoter Träger dieser Mutation ist. In der Studie von Lindemeyer et al. (2010) wies der homozygote Sohn keinen offenen Biss auf, während bei dem heterozygoten Vater bei Pavlic et al. (2007) ein solcher vorlag. Gutierrez et al. (2012) schließen aus diesen Fällen, dass der frontal offene Biss ein Merkmal mit unvollständiger Penetranz sein könnte.

### 6.1.3 Die Mutation im compound-heterozygoten Zustand

Im Folgenden wird an zwei Familien gezeigt, dass die beiden oben beschriebenen, mit der Mutation g.13185\_13186insAG einhergehenden Phänotypen, die generalisierten hypoplastischen Schmelzveränderungen bei Homozygotie und die lokalisierte Grübchenbildung (*enamel pitting*) bei Heterozygotie, nicht nur für diese Veränderung spezifisch sind.

In der aktuellen Literatur finden sich Fälle, bei denen die Genotypisierung von Patienten mit generalisierter hypoplastischer AI einen compound-heterozygoten Mutationsstatus mit einer weiteren ENAM-Mutation ergab. In der von Ozdemir et al. (2005) publizierte Studie waren zwei Töchter compound-heterozygot für die beiden oben genannten *Frameshift*-Mutationen. Nach Chan et al. (2010) trat bei einem betroffenen Sohn die Mutation g.13185\_13186insAG in Kombination mit der bis dahin nicht bekannten ENAM-Mutation g.12573C→T (c.647C→T; p.S216L) auf. Der Phänotyp beider Mädchen sowie des Jungen war mit dem

homozygoter Träger der Mutation g.13185\_13186insAG konsistent. Ein Mädchen hatte zusätzlich einen frontal offenen Biss.

Die heterozygoten Familienmitglieder beider Familien zeigten Phänotypen, die bereits mehrfach für den heterozygoten Zustand der Mutation g.13185\_13186insAG beschrieben wurden. Nach Ozdemir et al. (2005) waren der Vater und eine weitere Tochter heterozygot für die Veränderung g.12946\_12947insAGTCAGTACCAGTACTGTGTC; die Mutter und eine vierte Tochter waren heterozygote Trägerinnen der Mutation g. 13185\_13186insAG. Alle zeigten lokalisierte Schmelzgrübchen (*enamel pitting*). Nach Chan et al. (2010) war der Vater heterozygot für die Mutation g.13185\_13186insAG, die Mutter und der Bruder entsprechend für die Veränderung g.12573C→T. Vater und Mutter zeigten ebenfalls lokalisierte Schmelzgrübchen und der Bruder zusätzlich noch kreidig-weißen fluoroseartigen Zahnschmelz.

## **6.2 Vergleich der Merkmalsausprägungen der Patienten mit der Enamelin-Mutation g.13185\_13186insAG untereinander und der Literatur**

Im Rahmen dieser Studie wurde bei vier Personen die Sequenzvariation g.13185\_13186insAG als krankheitsverursachend nachgewiesen. Weitere pathogene Veränderungen im ENAM-Gen konnten mit den hier angewandten Methoden nicht aufgefunden werden. Die relativ hohe Prävalenz der ENAM-Mutation im Studienkollektiv wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Sie ist vermutlich darin begründet, dass bei diesen Patienten aufgrund ausgeprägter klinischer Merkmale v.a. im homozygoten Mutationszustand häufiger die Verdachtsdiagnose AI gestellt wird und diese somit gezielter einer molekulargenetischen Untersuchung zugeführt werden.

Mutationen auf beiden Allelen des ENAM-Gens wurden bei zwei Patienten (1a und 2) gefunden. Ein phänotypischer Vergleich dieser Patienten ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da Patient 2 zum Studienzeitpunkt bereits umfangreich prothetisch versorgt war und klinische Merkmale der AI nur noch an den Molaren sichtbar waren. Das Kardinalsymptom beider Patienten war eine generalisierte Hypoplasie der bleibenden Dentition. Bei Patient 1a waren alle Zähne so stark betroffen, dass die Approximalkontakte aufgehoben waren und die Kronenanatomie der Molaren und Prämolaren zum Teil konisch verändert war. Zusätzlich zeigten die Zahnoberflächen eine raue Beschaffenheit, die Zahnfarbe

war weitestgehend normal mit vereinzelt lokalen gelblichen Verfärbungen. Im Röntgenkontrast war keine Unterscheidung zwischen Dentin und Schmelz sichtbar, bei Zahn 34 fiel ein intrapulpäres bzw.- kanaläres Konkrement (Dentikel) auf. Die Summe aller Merkmale von Patient 1a war konsistent mit dem in der Literatur mehrfach beschriebenen Phänotyp dieser Mutation im homozygoten Zustand.

**Kommentar [A3]:** Ina: Röntgen-Bilder einfügen!!

Die Molaren von Patient 2 zeigten ein ähnliches klinisches Bild. Auch hier führte eine starke Reduktion der Schmelzschicht im OK zu konischen, gelblich imponierenden Zahnkronen mit fehlenden approximalen Kontakten. Röntgenaufnahmen von Patient 2 lagen nicht vor.

Bei zwei weiteren Patienten (Patient 3a und 3b) konnte die Mutation g.13185\_13186insAG im heterozygoten Zustand nachgewiesen werden. Es handelte sich bei diesen Personen um Mutter und Tochter. Klinische Angaben zur Merkmalsausprägung fehlten bei beiden Patienten, somit konnte für diese Patienten kein phänotypischer Vergleich erfolgen.

### 6.3 Auswirkungen der Mutation c.561\_562delCT im DLX3-Gen

AI vom hypoplastisch-Hypomaturationstyp in Verbindung mit Taurodontismus (AIHHT, OMIM 104510) wird durch eine autosomal-dominante Mutation (c.561\_562delCT, g.3179\_3180delCT, p.Y188Q) in der Homeodomäne des DLX3-Gens verursacht. Erstmalig beschrieben wurde dieser Zusammenhang von Dong et al. (2005). Es handelt sich dabei um eine *Frameshift*-Mutation, die über eine Deletion zweier Basenpaare (CT) an Position 560, am COOH-Terminus, zum Einbau eines verfrühten Stopp-Codons und somit zu einem um 88 AS verkürzten Genprodukt führt. Das Wildtyp-Protein verfügt über 287 AS (Lee et al. 2008, Dong et al. 2005).

Diese Sequenzvariation wurde als Mutation mit hoher Penetranz beschrieben. Sie zeichnet sich regelmäßig durch hypoplastischen Schmelz und vergrößerte Pulpenkammern (Taurodontismus) der Molaren aus; andere Gewebe sind nicht betroffen (Dong et al. 2005). Der Zahnschmelz wird als hart beschrieben; eine weitere posteruptive Reduzierung durch Abrasion bzw. Attrition scheint bei dieser Form der AI keine Rolle zu spielen. Die Zahnfarbe variiert innerhalb gelb-brauner Nuancierungen (Dong et al. 2005, Lee et al. 2008).

Die Diagnostik der AIHHT führt nicht selten zu Verwechslungen mit einem anderen Krankheitsbild, das u.a. durch ähnliche Zahnanomalien gekennzeichnet ist (Dong et al. 2005, Pavlic et al. 2007). Es handelt sich dabei um das Trichodento-ossäre Syndrom (TDO, OMIM 190320). Das TDO-Syndrom weist aber neben den Schmelzhypoplasien und Taurodontismus - beides Merkmale mit vollkommener Penetranz - im Gegensatz zur AIHHT noch zwei weitere, variable Kardinalsymptome auf: dichtes Kräuselhaar zum Zeitpunkt der Geburt und eine verdickte Kortikalis (Osteosklerose) der langen Röhrenknochen und der Schädelskalotte (Lee et al. 2008, Seow 1993, Pavlic et al. 2007). Die lockige Haarstruktur kann bis ins Erwachsenenalter erhalten bleiben; bei ca. 50 % der Fälle entwickelt sich über die Jahre glattes Haar (Pavlic et al. 2007). Weiterhin sind Minorsymptome wie multiple dentale Abszesse und Nagelpathologien möglich. Für dieses Syndrom, das zum Formenkreis der ektodermalen Dysplasien gehört, ist ebenfalls eine DLX3-Mutation in Exon 3 (c.571\_574delGGGG) ursächlich. Es wird daher von manchen Autoren als allelische Variante der AIHHT beschrieben (Dong et al. 2005). Die verursachende Veränderung, eine Deletion von vier Basenpaaren, liegt jedoch außerhalb der Homeodomäne und verkürzt das Protein am COOH-Terminus um 32 AS (Dong et al. 2005). Das TDO-Syndrom weist, zum Teil auch interfamiliär, klinische Heterogenität auf. Durch die variable Expression der Haar- und Knochenabnormalitäten sowie der Nageldysplasien bei manchen Betroffenen treten diese Merkmale phänotypisch überhaupt nicht in Erscheinung - ist eine Differenzierung zwischen AIHHT und TDO-Syndrom anhand klinischer Merkmale allein erschwert (Seow 1993, Dong et al. 2005, Pavlic et al. 2007). Bei beiden Mutationen kommt es durch die oben beschriebene Beeinflussung des COOH-Terminus zu dessen Ausfall. Das DLX3-Gen verfügt über zwei dieser COOH-Enden, jeweils einem an jeder Seite der Homeobox. Die transkriptionale Aktivität des DLX3-Gens ist jedoch abhängig von der Unversehrtheit dieser Subdomänen, so dass eine Verkürzung zum kompletten Funktionsverlust dieses Gens führt (Dong et al. 2005).

In unserer Studie konnte bei zwei Patienten (Patient 4a und 4b) die DLX3-Mutation c.561\_562delCT in heterozygotem Zustand nachgewiesen werden. Es handelte sich um Vater und Tochter. Für diese Patienten lagen keine spezifizierenden phänotypischen Angaben vor, der Schmelz wurde lediglich als hypoplastisch bezeichnet. Ob ein Taurodontismus auftrat, war nicht bekannt.



Ein Vergleich der Merkmalsausprägungen dieser Patienten untereinander und der Literatur war daher nicht möglich.

#### **6.4 Eine bislang unbekannte Mutation im WDR72-Gen als Ursache einer AI2**

Eine AI vom Hypomaturationstyp (AI2) wird neben Veränderungen in den Genen MMP20, KLK4 und AMELX auch durch Mutationen im WDR72-Gen verursacht. Phänotypisch zeichnet sich diese Form durch opaken, weiß-cremig bis orange-braun verfärbten Schmelz mit verminderter Transluzenz aus (El-Sayed et al. 2009). Die Zahnkronen sind beim Durchbruch normal geformt, die Approximalkontakte sind typischerweise nicht aufgehoben (Schroeder 1997, Hu et al. 2007). Die Zähne unterliegen jedoch recht schnell nach dem Durchbruch modifizierenden Einflüssen. So splittet der durch zurückbehaltene Schmelzproteine qualitativ defiziente Schmelz vom Dentin ab; Attrition führt oftmals zu sehr ausgedehnten Schmelzverlusten. Somit sind auch bei einer AI vom Hypomaturationstyp pathologische Zahnformen und interdentale Lücken zu beobachten (El-Sayed et al. 2009).

Arbeitsgruppen um El-Sayed et al. veröffentlichten folgende vier pathogene Mutationen im WDR72-Gen: c.2348C->G, p.S783X; c.2857delA; p.S953VfX20; c.2934G->A; p.W978X und c.2728C->T, p.R897X (El-Sayed et al. 2009, 2011). Lee et al. (2010) konnten eine weitere krankheitsverursachende Veränderung (g.57426\_57427delAT; c.1467\_1468delAT; p.V491fsX497) detektieren. Alle fünf Veränderungen waren in homozygotem Mutationszustand mit dem oben beschriebenen Phänotyp assoziiert. Heterozygote Mutationsträger waren nicht betroffen. El-Sayed et al. (2009) berichten zusätzlich vom Auftreten eines frontal offenen Bisses bei einem Patienten.

In der vorliegenden Untersuchung konnte bei drei Patienten mit einer AI2 (Patient 17a, 17b und 17c) eine Veränderung im WDR72-Gen in homozygoter Ausprägung nachgewiesen werden. Diese Mutation, eine ca. 103 kb große Deletion der Exons 13-18, wurde bislang noch nicht im Zusammenhang mit einer AI beschrieben. Der Phänotyp aller drei Patienten, es handelte sich um Geschwister, war jedoch konsistent mit einer AI vom Hypomaturationstyp, die sich durch umfangreichen posteruptiven Schmelzverlust auszeichnete und bereits mehrfach bei Patienten mit homozygoten WDR72-Mutationen beschrieben wurde

(El-Sayed et al. 2009, El-Sayed et al. 2011, Lee et al. 2010). Diese Mutation ist somit zweifelsfrei als pathogen einzuschätzen. Die klinischen Merkmale zeigten sich in beiden Dentitionen und an allen Zähnen. Bei zwei Patienten lag ein offener Biss vor. Bei den klinisch unauffälligen Eltern konnte die Veränderung in heterozygoter Ausprägung detektiert werden, es lag somit ein autosomal-rezessiver Erbgang vor.

Patient 17a befand sich zum Studienzeitpunkt in der zweiten Wechselgebissphase und war am stärksten betroffen. Alle Zähne waren orange-braun verfärbt, die Zahnkronen vielfach pathologisch geformt. An den Okklusal- bzw. Inzisalflächen imponierte eine raue Schmelzoberfläche wie von Lee et al. (2010) beschrieben. Der Patient zeigte einen frontal und seitlich offenen Biss. Patient 17b verfügte über ein vollständiges Milchgebiss und einen im Vergleich zu Patient 17a und 17c abgeschwächteren Phänotyp ohne offenen Biss. Auffällig waren die im Vergleich zum Restgebiss dunkler verfärbten Zähne 51 und 61 mit deutlicher Transluzenzminderung. Patient 17c verfügte über ein vollständiges permanentes Gebiss mit Platzmangel in der OK- und UK-Front sowie Eckzahnaußenstand im OK und Palatinalstand der Zähne 12 und 22. Auch hier lag, ähnlich wie bei Patient 17a, ein ausgeprägter hypomaturierter Phänotyp mit orange-braunen Verfärbungen und abnorm geformten Zahnkronen sowie ein offener Biss vor.

## 6.5 Neue Amelogenesis Imperfecta-Kandidatengene

Zu Beginn dieser Arbeit im Jahre 2009 waren sieben Gene bekannt, die die isolierte Form der AI verursachen können. Derzeit wurde jedoch oftmals in weniger als 50 % der AI-Fälle eine Mutation in diesen Genen nachgewiesen (Urzua et al. 2011, Kim et al. 2008). So wurde auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchung mit der molekulargenetischen Diagnostik von Patienten mit klinisch eindeutiger AI-Symptomatik mehrfach keine bekannte Mutation in den genannten Kandidatengenen als krankheitsverursachend aufgefunden. Aufgrund der hohen genetischen Heterogenität und dem oftmals sporadischen Auftreten dieser Erkrankung ist es wahrscheinlich, dass Veränderungen in weiteren Genen das Krankheitsbild ebenfalls hervorrufen.

Jüngste Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Poulter et al. (2013), Parry et al. (2013), Urzua et al. (2011), O'Sullivan et al. (2011) und Cho et al. (2011)

konnten pathogene Mutationen in Verdachtsgenen identifizieren, die im Rahmen dieser Arbeit nicht sequenziert wurden. Zwei Gene, C4orf26 und Laminin- $\beta$ 3 (LAMB3), waren mit isolierter AI assoziiert. Mutationen in den Genen SLC4A4 und FAM20A gingen mit zusätzlichen morphologischen Veränderungen weiterer Strukturen oder Erkrankungen einher. Im Folgenden werden diese AI-Kandidatengene kurz vorgestellt.

Manche Autoren postulierten potentielle AI-Kandidatengene, obwohl diese bisher beim Menschen nicht als mutationstragend nachgewiesen wurden. Untersuchungen von Iwasaki et al. (2005) und Gasse et al. (2012) gaben Anlass zu der Vermutung, dass das schmelzspezifische Amelotin (AMTN) möglicherweise mit der autosomal-rezessiven AI assoziiert sein könnte. Nach Kim et al. (2008) war AMTN ein Kandidatengenen für hypomaturierte AI-Formen. Muto et al. (2012) konnten zwar an Ratten mit autosomal-rezessiver AI das Gen Sp6 als krankheitsverursachend identifizieren, während sich Angaben zu AMTN-bedingten AI-Phänotypen beim Menschen in der Literatur nicht fanden.

Ameloblastin (AMBN), das ebenfalls für ein Schmelzprotein kodiert, wurde häufig als AI-Kandidatengenen benannt (Iwasaki et al. 2005). Seit der Identifikation seines Genlocus in der mit lokal hypoplastischer AI assoziierten Region (4q21), lag der Forschungsfokus auf dem Nachweis eines möglichen Zusammenhangs (MacDougall et al. 1997, Mardh et al. 2001). Mardh et al. (2001) charakterisierten das AMBN-Gen und konnten es nach genetischer Untersuchung von 20 betroffenen Familien und acht sporadischen Fällen als Ursache für die lokale hypoplastische AI ausschließen.

### 6.5.1 SLC4A4-Gen

Urzua et al. (2011) stellten die Frage nach neuen AI-relevanten Genen mit besonderem Augenmerk auf die pH-Regulierung während der Amelogenese. In diesem Zusammenhang wurde die Funktion der in diese Prozesse involvierten Gene der Familie SLC4 (*solute carrier family 4*), die u.a. für die Transportproteine SLC4A4 (*solute carrier family 4, member 4*; NBCe1) und SLC4A2 (*solute carrier family 4, member 2*; AE2) kodieren und als Bicarbonat-Transporteur während der sekretorischen Phase fungieren, besonders betrachtet. Zusätzlich wurden weitere beteiligte Gene, dargestellt durch ihre Produkte CFTR und Carboanhydrase II (CAII) als mögliche AI-Kandidatengene in Erwägung gezogen. Resümierend nominierten Urzua et al. (2011) jedoch das SLC4A4-Gen als das wahrscheinlichste neue AI-Gen. Sein Genlocus befindet sich auf Chromosom 4 (4q21) und somit in direkter Nachbarschaft zu den Genloci mehrerer mit der Zahnentwicklung assoziierten Gene. Immunhistochemische Analysen an Ratteninzisiven und -molaren zeigten, dass das Genprodukt, ein Membranprotein mit Ionentransportfunktion, an der basolateralen Ameloblastenmembran in der sekretorischen Phase exprimiert wird. Es existieren zwei Isoformen des SLC4A4-Proteins. Die aus 1035 AS bestehende Variante (NBCe1-A) wird in der Niere exprimiert, dem Pankreas entstammt die aus 1079 AS aufgebaute Form (NBCe1-B). SLC4A4-Mutationen waren bisher im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der proximalen renalen tubulären Azidose (*proximal renal tubular acidosis, pRTA*) beschrieben. Die betroffenen Patienten weisen neben einer Störung der renalen Säureausscheidung, pathologischen Veränderungen der Augen, Wachstumsretardierung und einer geminderten Intelligenz auch dentale Abnormitäten auf (Zhu et al. 2013). Nach Urzua et al. (2011) zeigten Patienten mit homozygotem Mutationsstatus für die NBC1-Mutation c.2311delA multiple Bereiche kreideartig verfärbten Zahnschmelzes. Der Phänotyp eines anderen Patienten, der homozygot für die Mutation c.1429C→T war, imponierte durch Schmelzhypoplasien mit großflächigen Schmelzfrakturen und gleichmäßig über alle Zähne verteilten Verfärbungen. Nach Urzua et al. (2011) wurden ähnliche dentale Phänotypen bereits 1979 in einer Publikation von Winsnes et al. bei Patienten mit pRTA beschrieben.

Publikationen zu SLC4A4-Mutationen, die eine alleinige AI-Symptomatik verursachen, ließen sich in der aktuellen Literatur nicht finden. Urzua et al. (2011)

konnten auch nur darüber spekulieren, dass Mutationen an anderen Orten des SLS4A4-Gens eine hypoplastische oder hypokalzifizierte AI bedingen.

### 6.5.2 FAM20A-Gen

Genetische Untersuchungen der Arbeitsgruppen um O'Sullivan (2011) und Cho (2011) identifizierten FAM20A-Mutationen bei Patienten mit AI, wobei diese in beiden Patientenkollektiven auch keine isolierte Entität darstellte. Obwohl die generalisierte hypoplastische AI als Kardinalsymptom bezeichnet wurde, zeigten alle betroffenen Patienten zusätzlich eine Gingivahyperplasie und weitere dentale Abnormitäten wie Dentikel, verzögerten Zahndurchbruch der permanenten Dentition, Zahnretentionen im Milchgebiss oder eine fehlerhafte Zahnentwicklung, die nicht näher bezeichnet wurde. Die Familie der FAM20-Gene (*Family with sequence similarity 20*) umfasst drei Mitglieder: FAM20A, FAM20B und FAM20C. Obwohl die Funktion des FAM20A-Gens auf Chromosom 17 (Genlocus 17q24.2) noch unbekannt ist, betonten die Autoren beider Publikationen die fundamentale Rolle dieses Gens im Ablauf der Amelogenese. Andererseits wurde aufgrund der betroffenen Gewebe und Strukturen seine Bedeutung für den Vorgang der Dentition und der Gingivahomöostase hervorgehoben. O'Sullivan et al. (2011) berichteten von einer konsanguinen Familie, in der das Auftreten der generalisierten hypoplastischen AI mit weiteren, oben genannten dentalen Abnormitäten in Kombination mit einer Gingivahyperplasie als syndromal bezeichnet wurde. Bei den Betroffenen wurde auf Chromosom 17 die *Nonsense*-Mutation g.64063478C→T (c.406C→T; p.Arg136X) in Exon 2 des FAM20A-Gens identifiziert. Heterozygote Mutationsträger zeigten keine klinischen Zeichen einer AI, was für einen autosomal-rezessiven Erbgang spricht. Molekulargenetische Analysen der Arbeitsgruppe von Cho et al. (2011) identifizierten in neun AI-betroffenen Familien mit ähnlichem Phänotyp wie von O'Sullivan et al. (2011) beschrieben in drei Familien mit autosomal-rezessivem Erbgang drei homozygote Mutationen im FAM20A-Gen (c.34\_35delCT, c.813-2A>G, c.1175\_1179delGGCTC). In einer Familie mit sporadischem Auftreten konnte eine Mutation im compound-heterozygoten Zustand als krankheitsverursachend ermittelt werden (c.590-2A>G + c.826C>T).

### 6.5.3 C4orf26-Gen

Parry et al. (2012) identifizierte in neun Familien mit isolierter hypomineralisierter AI fünf Mutationen in dem bis dato uncharakterisierten Gen C4orf26 (*chromosome 4 open reading frame 26*), lokalisiert auf Chromosom vier. Der Phänotyp, gelblich-braun verfärbter Schmelz mit zum Teil hypoplastischen Arealen, zeigte sich ausschließlich bei Personen mit homozygotem Mutationsstatus. Auf Grundlage dessen wird dieses Gen von den Autoren als mögliche Hauptursache für die rezessive AI in Betracht gezogen.

Das Genprodukt, ein azidisches Phosphoprotein mit 130 AS, steht aufgrund von In-Vitro-Untersuchungen im Verdacht, über eine fördernde Eigenschaft bezüglich initialer Hydroxylapatit-Kristallbildung und -wachstum, an der Mineralisationsphase beteiligt zu sein. Unterstützt wurde diese Annahme durch dessen enge räumliche Lagebeziehung zu anderen, in die Schmelzmineralisation involvierter Gene, darunter das mit AI assoziierte ENAM-Gen.

Die Genotypisierung einer konsanguinen omanischen Familie konnte bei betroffenen Mitgliedern einen homozygoten Haplotypen zwischen zwei bekannten SNP's (rs7679122 und rs17030727) auf Chromosom vier nachweisen. Die Mutation c.229C→T (p.Arg77\*) führte zum oben beschriebenen klinischen Bild. Eine Sequenzierung der bekannten Schmelzproteine ENAM, AMBN, AMTN und ODAM ergab keine krankheitsverursachende Veränderung. Die gleiche Mutation konnte bei drei weiteren betroffenen omanischen Familien nachgewiesen werden. Vier weitere C4orf26-Mutationen wurden in einer irakischen Familie (c.129C→A; p.Cys43\*), in einer syrischen Familie (c.68-2A→T; p.?) und in amerikanischen Familien (c.3188G→A; p.Trp106\* und c.51\_56delGGTAACins ATGCTGGTACTGGTA; p.Val18Cysfs\*23) identifiziert.

### 6.5.4 LAMB3-Gen

Mutationen im Laminin-β3-Gen (LAMB3), lokalisiert auf Chromosom 1, waren bisher als eine Ursache der junktionalen Epidermolysis bullosa (JEB) bekannt. Es handelt sich hierbei um eine angeborene Form der Epidermolysis bullosa, einer Gruppe von Erkrankungen, die zu fragiler Haut mit spontaner Blasenbildung und Erosionen neigt. Die meisten von JEB betroffenen Patienten zeigen neben diesen Hauterscheinungen noch Schmelzdefekte von variabler Ausprä-

gung. Sie sind ausschließlich durch homozygote LAMB3-Mutationen oder einer compound-heterozygoten Veränderung (LAMB3-Mutation in Kombination mit einer Mutation im COL17A1-Gen) bedingt. Es liegt also für diese Erkrankung ein rezessiver Erbgang zugrunde. Für dieses Gen sind keine heterozygoten Träger beschrieben, die einen entsprechenden Phänotyp aufweisen (Poulter et al. 2013).

Anders verhält es sich bei Patienten mit LAMB3-Veränderungen, die ausschließlich von Schmelzdysplasien betroffen sind. Poulter et al. (2013) publizierten erstmals das Auftreten einer LAMB3-assoziierten isolierten AI-Symptomatik mit dominantem Erbgang. Die heterozygote *Frameshift*-Mutation c.3392\_3393insAG (p.E1133Gfs\*27) war Ursache für eine generalisierte hypoplastische AI der Betroffenen einer irischen Familie. Die bis dahin bekannten, mit dominanter AI einhergehenden Gene ENAM und FAM83H konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Das LAMB3-Gen kodiert für eine von drei Untereinheiten des Glycoproteins Laminin-5. Dieses hat mehrere Funktionen in der Basallamina der Haut und in der Basallamina der sich entwickelnden Zahnanlage (<http://ghr.nlm.nih.gov>). Diese Basallamina spielt, wie unter Kap. 2.1.2 beschrieben, eine wichtige Rolle für den regelrechten Ablauf der Amelogenese. Eine fehlerhafte LAMB3-Genexpression, basierend auf der heterozygoten Mutation c.3392\_3393insAG, führt zu einer mangelhaften Ameloblastenadhäsion an die sezernierte Schmelzmatrix mit Unterbrechung der Sekretionsphase. Das Ergebnis ist eine hypoplastische Schmelzschicht (Poulter et al. 2013).

## 7 Schlussfolgerungen

*Enamelin* ist das am häufigsten veränderte Gen bei einer AI. Der klinische Phänotyp von ENAM-Mutationen ist durch zahlreiche Publikationen gut beschrieben. So hat sich herausgestellt, dass Mutationen in diesem Gen zu hypoplastischen Schmelzdefekten (AI1) führen. Diese können in Abhängigkeit von Mutationsart und Erbgang in Ausprägung und Schweregrad zum Teil stark variieren. Der resultierende Phänotyp der in dieser Studie nachgewiesenen ENAM-Mutation g.13185\_13186insAG imponierte bei den homozygoten Trägern durch eine generalisierte Schmelzhypoplasie der gesamten permanenten Dentition. Bei einem Patienten war zusätzlich das Milchgebiss in schwächerer Ausprägung betroffen. Diese Patienten waren als einziges Familienmitglied erkrankt. Es lag ein rezessiver Erbgang zugrunde (ARAI). Das Erscheinungsbild einer generalisierten hypoplastischen AI bei homozygotem Mutationszustand ist durch mehrere Autoren übereinstimmend mit unseren Patienten beschrieben. Ein frontal offener Biss wird oftmals – jedoch nicht in jedem Fall - als weiteres dominantes Merkmal bei homozygoter Trägerschaft aufgeführt. Dies traf auf 50 % unserer Patienten zu. Ein Studienziel war es herauszufinden, ob Mutationen im gleichen Gen immer mit dem gleichen Erbgang assoziiert sind und ob es Variationen in der Penetranz gibt. Da zum klinischen Erscheinungsbild der heterozygoten Träger keine spezifizierenden Angaben eingeholt werden konnten, war ein phänotypologischer Vergleich dieser Patienten nicht möglich. Es konnte somit durch diese Untersuchung auch nicht verifiziert werden, ob die mit heterozygoter Trägerschaft assoziierte lokale hypoplastische AI wie beschrieben in ihrer Expression variabel ist und ob auch eine unvollständige Penetranz zu einer Abweichung vom klassischen Vererbungsmuster führen kann. Da es sich bei den Betroffenen aber um Mutter und Tochter handelte, ist ein dominantes Vererbungsmuster anzunehmen (ADAI). Die Mutter war weniger stark betroffen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung ergaben in Übereinstimmung mit der Literatur, dass die ENAM-Mutation g.13185\_13186insAG sowohl eine ADAI als auch eine ARAI, resultierend in unterschiedlichen Phänotypen, verursachen kann.

Die ebenso mehrfach in der Literatur beschriebene AI vom Hypomaturationstyp (AI2), bedingt durch Mutationen im WDR72-Gen, konnte in dieser Untersu-



chung bei drei Patienten (Geschwister) einer konsanguinen Familie molekulargenetisch bestätigt werden. Ursächlich war bei allen Betroffenen eine bisher unbekannte Deletion der Exons 13-18 in homozygoter Ausprägung. Die Phänotypen waren konsistent mit den publizierten klinischen Zeichen der bekannten WDR72-Mutationen. Da die klinisch nicht betroffenen Eltern heterozygot für diese Veränderung waren, bedingt auch diese Deletion eine ARAI.

Der Nachweis dieser als pathogen einzuschätzenden Veränderung erfolgte im Rahmen einer extern durchgeführten Exom-Sequenzierung. Neueste Sequenzierungstechnologien („*next-generation sequencing*“, NSG) machen es möglich, dass alle proteinkodierenden Sequenzen, das sog. Exom, gleichzeitig sequenziert werden können (Neveling und Hoischen, 2012). Der Begriff „NSG“ umfasst verschiedene neue Sequenzierungsmethoden. Da alle einen höheren Durchsatz als die Standard-Methode der „Sanger-Sequenzierung“ aufweisen, sprechen Neveling und Hoischen (2012) von einer neuen Ära des Sequenzierens, die zukünftig auch für die molekulare Diagnostik große Bedeutung erlangen wird. Neveling und Hoischen (2012) sehen es als erwiesen, dass bei einer rezessiven Erkrankung mit gleichzeitiger Blutsverwandtschaft der gesunden Eltern die krankheitsverursachende Mutation eine homozygote Veränderung innerhalb eines homozygoten Abschnitts des Erkrankten ist, wobei beide Eltern einen heterozygoten Mutationsstatus aufweisen. Somit ist es sinnvoll, v.a. bei konsanguinen Familien vorab diese homozygoten Areale mittels SNP-Array zu detektieren. Erst dann folgt die Sequenzierung der Kandidatengene.

Die Diagnose der AI ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt, auch unter Einbeziehung der molekulargenetischen Untersuchung, weiterhin mit Unsicherheiten verbunden ist. Die klinische Diagnostik allein erfüllt aufgrund der hohen klinischen Variabilität mit Ähnlichkeiten zu anderen Krankheitsbildern nicht die Anforderung eines diagnostisch akzeptablen Verfahrens. Die molekulargenetische Untersuchung konnte jedoch auch bei Patienten mit eindeutiger AI-Symptomatik diese nicht verifizieren. Gründe hierfür dürften neben dem sporadischen Auftreten der Erkrankung auch in deren genetischer Heterogenität zu suchen sein, was die Existenz weiterer AI-verursachender Gene sehr wahrscheinlich erscheinen lässt.

## 8 Literaturverzeichnis

Aldred MJ, Crawford PJM, Roberts E, Thomas NST. 1992a. Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Genet*, 90:413-416.

Aldred MJ, Crawford PJM, Roberts E, Gillespie CM, Thomas NST, Fenton I, Sandkuijl LA, Hart PS. 1992b. Genetic heterogeneity in X-linked amelogenesis imperfecta. *Genomics*, 14:567-573.

Aldred MJ, Crawford PJ. 1995. Amelogenesis imperfecta - towards a new classification. *Oral Dis*, 1(1):2-5.

Aldred MJ, Crawford PJM, Savarirayan R. 2003. Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century. *Oral Dis*, 9:19-23.

Arnold WH. 2006. Mikromorphologie und Molekularbiologie der Dentinogenese und Amelogenese. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 61: 524-534.

Becerik S, Cogulu D, Emingil D, Han T, Hart PS, Hart TC. 2009. Exclusion of candidate genes in seven turkish families with autosomal recessive amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet Part A*, 149A:1392-1398.

Chan HC, Mai L, Oikonomopoulou A, Chan HL, Richardson AS, Wang SK, Simmer JP, Hu JC-C. 2010. Altered enamelin phosphorylation site causes amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*, 89:695-699.

Chan HC, Estrella NMRP, Milkovich RN, Kim JW, Simmer JP, Hu JCC. 2011. Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *Eur J Oral Sci*, 119:311-323.

Chaudhary M, Dixit S, Singh A, Kunte S. 2009. Amelogenesis imperfecta: Report of a case and review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol*, 13:70-7.

Cho SH, Seymen F, Lee KE, Lee SK, Kweon YS, Kim KJ, Jung SE, Song SJ, Yildirim M et al. 2011. Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Hum Mutat*, 33:91-94.

Cichon P, Grimm WD. 1998. Zahnheilkunde für behinderte Patienten. Erste Aufl. Hannover: Schlütersche-Verlag, 92.

Crawford PJM, Aldred MJ. 1992. X-linked amelogenesis imperfecta. Presentation of two kindreds and a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 73:449-455.

Crawford PJM, Aldred M, Bloch-Zupan A. 2007. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*, 2:17-28.

Dörr N. 2009. Vergleichende experimentelle Untersuchungen zur remineralisierenden Wirkung einer Zahnpflegepaste mit CPP-ACP-Komplex [Dissertation]. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität.

Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu TT, Escamilla M, MacDougall M. 2005. DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Am J Med Genet A*, 133:138-141.

Eckardt N. 2001. Die Geschichte der Histogenese und Histologie des Zahnschmelzes zwischen 1770 und 1890 [Dissertation]. Bochum: Ruhr-Universität.

El-Sayed W, Parry DA, Shore RC, Ahmed M, Jafri H, Rashid Y, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Kirkham J, Inglehearn CF et al. 2009. Mutations in the beta propeller WDR72 cause autosomal-recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 85:699-705.

El-Sayed W, Shore RC, Parry DA, Inglehearn CF, Mighell AJ. 2011. Hypomaturation amelogenesis imperfecta due to WDR72 mutations: a novel mutation and ultrastructural analyses of deciduous teeth. *Cells Tissues Organs*, 194:60-66.

- Fan D, Iijima M, Bromley KM, Yang X, Mathew S, Moradian-Oldak J. 2011. The cooperation of enamelin and amelogenin in controlling octacalcium phosphate crystal morphology. *Cells Tissues Organs*, 194(2-4):194-198.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. 1999. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol*, 126:270-299.
- Gasse B, Silvent J, Sire JY. 2012. Evolutionary analysis suggests that AMTN is enamel-specific and a candidate for AI. *J Dent Res*, 91(11):1085-1089.
- Gutierrez S, Torres D, Briceno I, Gomez AM, Baquero E. 2012. Clinical and molecular analysis of the enamelin gene ENAM in Colombian families with autosomal dominant amelogenesis imperfecta. *Genet Molec Biol*, 35(3):557-566.
- Hedge S. 2012. Multiple unerupted teeth with amelogenesis imperfecta in siblings. *North Am J Med Sci*, 4:235-237.
- Hart TC, Hart PS, Gorry MC, Michalec MD, Ryu OH, Uygur C, Ozdemir D, Firatli S, Aren G, Firatli E. 2003. Novel ENAM mutation responsible for autosomal recessive amelogenesis imperfecta and localized enamel defects. *J Med Genet*, 40:900-906.
- Hu JC, Yamakoshi Y. 2003. Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6:387-398.
- Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer J. 2007. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*, 186:78-85.
- Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, Gao Y, Wendel M, Ganns B. 2005. Amelotin- a novel secreted, ameloblast-specific protein. *J Dent Res*, 84:1127-1132.

- Kang HY, Seymen F, Lee SK, Yildirim M, Bahar Tuna E, Patir A, Lee KE, Kim JW. 2009. Candidate gene strategy reveals ENAM mutations. *J Dent Res*, 88(3):266-269.
- Kida M, Ariga T, Shirakawa T, Oguchi H, Sakiyama Y. 2002. Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by an enamelin gene mutation at the exon-intron boundary. *J Dent Res*, 81(11):738-742.
- Kim JW, Seymen F, Lin BP, Kiziltan B, Gencay K, Simmer JP, Hu JC. 2005. ENAM mutations in autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*, 84(3):278-282.
- Kim JW, Simmer JP, Lin BP, Seymen F, Bartlett JD, Hu JC. 2006. Mutational analysis of candidates genes in 24 amelogenesis imperfecta families. *Eur J Oral Sci*, 114:3-12.
- Kim JW, Lee SK, Lee ZH, Park JC, Lee KE, Lee MH et al. 2008. FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 82:489-494.
- Kirchmann C, Zipprich J. 2007. Amelogenesis imperfecta beim zweijährigen Patienten. *ZM*, 97(7):46-50.
- Koch MJ. 2007. Entwicklung der Zähne. Grundlagen genetisch bedingter Zahnveränderungen. *Med Genet*, 19:392-398.
- Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright JT, Paine ML. 2010. Regulation of pH during amelogenesis. *Calcif Tissue Int*, 86:91-103.
- Lee SK, Hu JC, Bartlett JD, Lee KE, Lin BPJ, Simmer JP, Kim JW. 2008. Mutational spectrum of FAM83H: the C-terminal portion is required for tooth enamel calcification. *Hum Mutat*, 29(8):E95-E99.

Lee SK, Seymen F, Lee KE, Kang HY, Yildirim M, Bahar Tuna E, Gencay K, Hwang YH, Nam KH, De La Garza RJ et al. 2010. Novel WDR72 mutation and cytoplasmic localization. *J Dent Res*, 89:1378-1382.

Lindemeyer RG, Gibson CW, Wright T. 2010. Amelogenesis imperfecta due to a mutation of the enamelin gene: clinical case with genotype-phenotype correlations. *Pediatr Dent*, 32(1):56-60.

Linß W, Fanghänel J. 1999. Histologie. Berlin und New York: de Gruyter-Verlag, 156-161.

MacDougall M, Dupont BR, Simmons D, Reus B, Krebsbach P, Kärman C, Holmgren G, Leach RJ, Forsman K. 1997. Ameloblastin gene (AMBN) maps within the critical region for autosomal dominant amelogenesis imperfecta at chromosome 4q21. *Genomics*, 41:115-118.

Mardh KC, Bäckmann B, Simmons D, Golovleva I, Gu TT, Holmgren G, MacDougall M, Forsman-Semb K. 2001. Human ameloblastin gene: genomic organization and mutation analysis in amelogenesis imperfecta patients. *Eur J Oral Sci*, 109:8-13.

Muto T, Miyoshi K, Horiguchi T, Hagita H, Noma T. 2012. Novel genetic linkage of rat Sp6 mutation to Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*, 7-34.

Neveling K, Hoischen A. 2012. Exom-Sequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen. *Med Gen*, 24:4-11.

OMIM. 2010. Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.

O'Sullivan J, Bitu CC, Daly SB, Urquhart JE, Barron MJ, Bhaskar SS, Martelli-Junior H, Dos Santos Neto PE, Mansilla MA, Murray JC et al. 2011. Whole-exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *Am J Genet*, 88:616-620.

Ozdemir D, Hart PS, Firatli E, Aren G, Ryu OH, Hart TC. 2005. Phenotype of ENAM mutations is dosage-dependent. *J Dent Res*, 84:1036-1041.

Parry DA, Brookes SJ, Logan CV et al. 2012. Mutations in the C4orf26, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta. *Am J Human Genet*, 91:565-571.

Pavlic A, Petelin M, Battelino T. 2007. Phenotype and enamel ultrastructure characteristics in patients with ENAM gene mutations g.13185\_13186insAG and 8344delG. *Arch Oral Biol*, 52:209-217.

Poulter JA, El-Sayed W, Shore RC, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. 2013. Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation in LAMB3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Euro J Human Genet*, 1-4.

Schroeder HE. 1997. Pathobiologie oraler Strukturen. Dritte Aufl. Basel: Karger-Verlag.

Schüler IM, Heinrich-Weltzien R. 2010. Diagnostik und Therapie von Strukturstörungen der Zahnhartsubstanz im Kindes- und Jugendalter- Teil 3. [www.zmk-aktuell.de](http://www.zmk-aktuell.de).

Seow WK. 1993. Taurodontism of the mandibular first permanent molar distinguishes between the tricho-dento-osseus (TDO) syndrome and amelogenesis imperfecta. *Clin Genet*, 43:240-246.

Siegenthaler W, Blum HE. 2006. Klinische Pathophysiologie. Neunte Aufl. Thieme-Verlag, 33.

Simmer JP, Hu JC. 2001. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ*, 65:896-905.

Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, Hu JC-C. 2010. Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res*, 89(10):1024-1038.

Steffen R. 2007. Taurodontismus und Klinefelter-Syndrom. *Med Gen*, 19:432-434.

Strachnan T, Read AP. 1996. Molekulare Humangenetik. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

Umland NH. 2003. Der Einfluß lokaler Fluoridierungsmaßnahmen auf die Fluoridaufnahme, Retention und die Mineralisation kariöser Initialläsionen in vitro [Dissertation]. Freiburg i. Brg.: Albert-Ludwigs-Universität.

Urzua B, Ortega-Pinto A, Morales-Bozo I, Rojas-Alcayaga G, Cifuentes V. 2011. Defining a new candidate gene for amelogenesis imperfecta: from molecular genetics to biochemistry. *Biochem Genet*, 49:104-121.

Witkop Jr CJ. 1988. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol*, 17:547-553.

Wright JT, Hart PS, Aldred MJ, Seow K, Crawford PJ, Hong SP et al. 2003. Relationship of phenotype and genotype in X-linked amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res*, 44(1):72-8.

Wright TW. 2007. The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A*, 140(23):2547-2555.

Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred MJ, Hart PS, Hart TC. 2011. Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. *Cells Tissues Organs*, 194:279-283.



Zhu Q, Shao XM, Kao L, Azimov R, Weinstein AM, Newman D, Liu W, Kurtz I. 2013. Missense mutation T485S alters NBCe1-A electrogenicity causing proximal renal tubular acidosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 305(4):392-405.

## 9 Anhang

### Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kandidatengene der AI	19
Tab. 2: PCR-Ansatz für das ENAM-Gen	33
Tab. 3: PCR-Ansatz jeweils für das AMELX-Gen und das KLK4-Gen	34
Tab. 4: PCR-Ansatz für das DLX3-Gen	34
Tab. 5: PCR-Ansatz für das WDR72-Gen	35
Tab. 6: PCR-Ansatz für das MMP20-Gen	35
Tab. 7: PCR-Ansatz für das FAM83H-Gen	36
Tab. 8: Template-Menge für die Sequenzierungs-PCR	38
Tab. 9: PCR-Programm SEQUENZ	38
Tab. 10: Primer-Eigenschaften für das ENAM-Gen	40
Tab. 11: PCR-Programm Enamelin-Gradient für das ENAM-Gen	41
Tab. 12: Primer-Eigenschaften für das AMELX-Gen	42
Tab. 13: PCR-Programm SPAST-Seq. für das AMELX-Gen	42
Tab. 14: Primer-Eigenschaften für das DLX3-Gen	43
Tab. 15: PCR-Programm SPAST-Seq. für das DLX3-Gen	43
Tab. 16: Primer-Eigenschaften für das WDR72-Gen	43
Tab. 17: PCR-Programm SPAST-Seq. für das WDR72-Gen	46
Tab. 18: Primer- Eigenschaften für das MMP20-Gen	46
Tab. 19: PCR-Programm SPAST-Seq. für das MMP20-Gen	47
Tab. 20: Primer-Eigenschaften für das KLK4-Gen	47
Tab. 21: PCR-Programm SPAST-Seq. für das KLK4-Gen	48
Tab. 22: Primer-Eigenschaften für das FAM83H-Gen	48
Tab. 23: PCR-Programm FAM-Gradient für das FAM83H-Gen	50
Tab. 24: Studienteilnehmer Familie 1	51
Tab. 25: Studienteilnehmer Familie 2	53
Tab. 26: Studienteilnehmer Familie 3	55
Tab. 27: Studienteilnehmer Familie 4	56
Tab. 28: Studienteilnehmer Familie 5	57
Tab. 29: Studienteilnehmer Familie 6	59
Tab. 30: Studienteilnehmer Familie 7	61
Tab. 31: Studienteilnehmer Familie 8	64

---

Tab. 32: Studienteilnehmer Familie 9	66
Tab. 33: Studienteilnehmer Familie 10	69
Tab. 34: Studienteilnehmer Familie 11	72
Tab. 35: Studienteilnehmer Familie 12	73
Tab. 36: Studienteilnehmer Familie 13	74
Tab. 37: Studienteilnehmer Familie 14	75
Tab. 38: Studienteilnehmer Familie 15	76
Tab. 39: Studienteilnehmer Familie 16	77
Tab. 40: Studienteilnehmer Familie 17	78
Tab. 41: Klassifikation der Amelogenesis imperfecta nach Witkop	112
Tab. 42: Mutationen in den AI-verursachenden Genen	116-121

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Stadien der Amelogenese	4
Abb. 2: Interaktion der in die Amelogenese involvierten Proteine	10
Abb. 3: Patient 1a: Frontalansicht in statischer Okklusion	52
Abb. 4: Patient 1a: Frontalansicht Regio 12 bis 22 und 33 bis 42	52
Abb. 5: Patient 1a: OK-Übersichtsaufnahme	52
Abb. 6: Patient 1a: UK-Übersichtsaufnahme	52
Abb. 7: Patient 1a: Rechtes Seitenzahngebiet	52
Abb. 8: Patient 1a: Bissflügel-Aufnahme links	52
Abb. 9 Patient 2: Frontalansicht	53
Abb. 10: Patient 2: OK-Übersichtsaufnahme	53
Abb. 11: Patient 2: UK-Übersichtsaufnahme	54
Abb. 12: Patient 2: Zahn 27	54
Abb. 13: Patient 5a: Frontalansicht	57
Abb. 14: Patient 5a: Linkes Seitenzahngebiet	57
Abb. 15: Patient 5a: Rechtes Seitenzahngebiet	57
Abb. 16: Patient 5a: OK-Übersichtsaufnahme	57
Abb. 17: Patient 5a: UK-Übersichtsaufnahme	58
Abb. 18: Patient 5b: Frontalansicht	58
Abb. 19: Patient 5b: Linkes Seitenzahngebiet	58
Abb. 20: Patient 5b: Rechtes Seitenzahngebiet	58
Abb. 21: Patient 6a: Frontalansicht	59
Abb. 22: Patient 6a: Frontalansicht Regio 12 bis 22 und 32 bis 42	59
Abb. 23: Patient 6a: OK-Übersichtsaufnahme	59
Abb. 24: Patient 6a: UK-Übersichtsaufnahme	59
Abb. 25: Patient 7a: Frontalansicht	61
Abb. 26: Patient 7a: Frontalansicht Regio 12 bis 22 und 33 bis 43	61
Abb. 27: Patient 7a: OK-Übersichtsaufnahme	61
Abb. 28: Patient 7a: UK-Übersichtsaufnahme	61
Abb. 29: Patient 7a: Rechtes Seitenzahngebiet	62
Abb. 30: Patient 7a: Linkes Seitenzahngebiet	62
Abb. 31: Patient 7b: Frontalansicht	62
Abb. 32: Patient 7b: Frontalansicht Regio 12 bis 23 und 33 bis 43	62
Abb. 33: Patient 7b: Frontalansicht Regio 11, 21 und 32 bis 42	62
Abb. 34: Patient 7b: OK-Übersichtsaufnahme	62
Abb. 35: Patient 7b: UK-Übersichtsaufnahme	63
Abb. 36: Patient 8a: Frontalansicht in statischer Okklusion	64

Abb. 37: Patient 8a: Frontalansicht Regio 12 bis 22	64
Abb. 38: Patient 8a: OK-Übersichtsaufnahme	65
Abb. 39: Patient 8a: UK-Übersichtsaufnahme	65
Abb. 40: Patient 9a: Frontalansicht 1. Dentition bei Erstvorstellung	66
Abb. 41: Patient 9a: OK-Übersichtsaufnahme 1. Dentition bei Erstvorstellung	66
Abb. 42: Patient 9a: UK-Übersichtsaufnahme 1. Dentition bei Erstvorstellung	67
Abb. 43: Patient 9a: Zahn 46 im Durchbruch	67
Abb. 44: Patient 9a: OK-Übersichtsaufnahme 2. Dentition	67
Abb. 45: Patient 9a: UK-Übersichtsaufnahme 2. Dentition	67
Abb. 46: Patient 9b: Frontalansicht Regio 12 bis 22 und 33 bis 43	67
Abb. 47: Patient 9b: Frontalansicht Regio 11	67
Abb. 48: Patient 9b: Frontalansicht Regio 21	68
Abb. 49: Patient 10a: Statische Okklusion von links	70
Abb. 50: Patient 10a: Statische Okklusion von rechts	70
Abb. 51: Patient 10a: Zähne 41-45	70
Abb. 52: Patient 10b: Frontalansicht in statischer Okklusion	70
Abb. 53: Patient 10b: OK-Übersichtsaufnahme	70
Abb. 54: Patient 10b: UK-Übersichtsaufnahme	70
Abb. 55: Patient 10a: OPG	71
Abb. 56: Patient 10b: OPG	71
Abb. 57: Patient 11: Frontalansicht	72
Abb. 58: Patient 11: OK-Übersichtsaufnahme	72
Abb. 59: Patient 11: UK-Übersichtsaufnahme	72
Abb. 60: Patient 11: Rechtes Seitenzahngebiet	72
Abb. 61: Patient 11: Linkes Seitenzahngebiet	73
Abb. 62: Patient 14: Frontalansicht	75
Abb. 63: Patient 17a: Frontalansicht in statischer Okklusion	78
Abb. 64: Patient 17a: UK-Übersichtsaufnahme	78
Abb. 65: Patient 17a: OK-Übersichtsaufnahme	78
Abb. 66: Patient 17a: Statische Okklusion von rechts	78
Abb. 67: Patient 17a: Statische Okklusion von links	79
Abb. 68: Patient 17b: Frontalansicht in statischer Okklusion	79
Abb. 69: Patient 17b: UK-Übersichtsaufnahme	79
Abb. 70: Patient 17b: OK-Übersichtsaufnahme	79
Abb. 71: Patient 17b: Statische Okklusion von rechts	79
Abb. 72: Patient 17b: Statische Okklusion von links	80
Abb. 73: Patient 17c: Frontalansicht in statischer Okklusion	80

Abb. 74: Patient 17c: UK-Übersichtsaufnahme	80
Abb. 75: Patient 17c: OK-Übersichtsaufnahme	80
Abb. 76: Patient 17c: Statische Okklusion von rechts	80
Abb. 77: Patient 17c: Statische Okklusion von links	80
Abb. 78: Varianten eines AMELX-assoziierten, generalisierten hypoplastischen Phänotyps	113
Abb. 79: Generalisierte Hypoplasie mit Grübchenbildung	114
Abb. 80: Lokalisierte Hypoplasie mit horizontalen Grübchenbanden	114
Abb. 81: Weiß-fleckiger, fluoroseartiger Phänotyp	115
Abb. 82: AMELX-assoziiertes, charakteristischer männlicher Phänotyp	115
Abb. 83: MMP20-assoziiertes Phänotyp	115
Abb. 84: KLK4-assoziiertes Phänotyp	115
Abb. 85: Hypokalzifizierte AI neu durchgebrochener Zähne	115
Abb. 86: Ausgeprägter Phänotyp einer hypokalzifizierten AI	115

### Klassifikation der AI

Tab. 41 (zu Kap. 2.4): Klassifikation der Amelogenesis imperfecta nach Witkop (1988)

Typ	Erbgang
1. Hypoplastische Formen 1.A. getüpfelt („pitted“) 1.B. lokalisiert 1.C. lokalisiert 1.D. glatt 1.E. glatt 1.F. rau 1.G. Schmelzagenesie	Autosomal dominant Autosomal dominant Autosomal rezessiv Autosomal dominant X-chromosomal dominant Autosomal dominant Autosomal rezessiv
2. Hypomaturation 2.A. pigmentiert 2.B. Hypomaturation	Autosomal rezessiv X-chromosomal rezessiv
3. Hypokalzifikation 3.A. Hypokalzifikation 3.B. Hypokalzifikation	Autosomal dominant Autosomal rezessiv
4. Amelogenesis imperfecta mit Tau-rodontismus	Autosomal dominant

**Fotodokumentation der verschiedenen AI-Phänotypen****AI 1 (zu Kap. 2.4.1): hypoplastischer Typ****AMELX-assoziiierter, generalisierter hypoplastischer Phänotyp**

**Abb. 78: (aus Wright 2007 und Kita et. al 2007): Varianten eines AMELX-assoziierten, generalisierten hypoplastischen Phänotyps**

**A: Variante eines männlichen Phänotypen**

**B: Weiblicher Phänotyp mit typischen horizontalen Furchen**

**C: Schwere Ausprägung eines männlichen Phänotypen**

**D: Weiblicher Phänotyp**



**ENAM assoziierter, hypoplastischer Phänotyp**

**Abb. 79 (aus Wright 2007):**  
**Generalisierte Hypoplasie mit Grübchenbildung**



**Abb. 80 (aus Wright 2007):**  
**Lokalisierte Hypoplasie mit horizontalen Grübchenbanden**

**AI2 (zu Kap. 2.4.2): Hypomaturationsstyp**

**Abb. 81 (aus Crawford et al. 2007):**  
Weiß-fleckiger, fluoroseartiger Phänotyp



**Abb. 82 (aus Wright 2007):**  
AMELX-assoziiertes, charakteristisches  
männliches Phänotyp



**Abb. 83 (aus Wright 2007):**  
MMP20-assoziiertes Phänotyp



**Abb. 84 (aus Wright 2007):**  
KLK4-assoziiertes Phänotyp

**AI3 (zu Kap. 2.4.3): Hypokalzifikationsstyp**

**Abb. 85 (aus Wright 2007):** Hypokalzifizierte AI  
neu durchgebrochener Zähne



**Abb. 86: (aus Crawford et al. 2007):** Ausgepräg-  
ter Phänotyp einer hypokalzifizierten AI

## Genetische Grundlagen der AI

Tab. 42: Mutationen in den AI-verursachenden Genen

Gen	Erbgang	Gen- locus	Mutation (cDNA; Protein)	Phänotyp/Quelle
<b>Amelogenin</b>	<i>X- chromosomal</i>	Exon 2	c.2T→C; p.M1T	Hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
<b>(AMELX)</b>		Exon 2	c.11G→C; p.W4S	Hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 2	c.11G→A; p.W4x	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 2	c.14_22del; p.15_A8delinsT	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 3 - 7	c.55_54del; p.18del	Hypomaturiert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.152C→T; p.T511	Hypomaturiert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.152C→G; p.P52R	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.155delC; p.P52fsX53	Hypomaturiert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 6	c.208C→A; p.P70T	Hypomaturiert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 6	c.230A→T; p.H77L	Hypoplastisch/ hy- pomineralisiert (aus Urzua et al. 2011)

Gen	Erbgang	Gen- locus	Mutation (cDNA; Protein)	Phänotyp/Quelle
		Exon 6	c.385delC; p.H129fsX187	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 6	c.420delC; p.Y141fsx187	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 6	c.473delC; p.P158fsx187	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 6	c.541delC; p.L181fsX187	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 6	c.571G→T; p.E191X	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
<b>Enamelin</b>	<b>Autosomal- dominant</b>	Exon 5	c.157A→T; p.K53X	Lokal hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
<b>(ENAM)</b>		Intron 6	c.211-2A→C; p.M71_Q157del	Generalisiert hypop- lastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Intron 8	c.534+1G→A; p.A158_Q178del	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 9	c.817G→T; p.R179M	Generalisiert hypop- lastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Intron 9	c.588+1delG; p.N197fsX277	Glatt hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)

Gen	Erbgang	Gen- locus	Mutation (cDNA; Protein)	Phänotyp/Quelle
		Exon 10	c.647C→T; p.S216L	Heterozygotie: LHED kombinierte Heterozygotie: generalisiert hypoplastisch (aus Chan et al. 2010)
		Exon 10	c.737C→A; p.S246X	Lokal hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 10	c.2991delT; p.L998fsX1062	Lokal und generalisiert hypoplastisch (aus Urzua et al. 2011)
	<b>Autosomal-dominant und rezessiv</b>	Exon 10	c.1258_1259insAG; p.P422fsX448	Heterozygotie: LHED Homozygotie: generalisiert hypoplastisch mit offenem Biss (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 10	c.1020_1021insAGCTAG TACCAGTA CTGTGTC; p.V340_M341insSSQYQ YCV	Heterozygotie: LHED kombinierte Heterozygotie: generalisiert hypoplastisch mit offenem Biss (aus Urzua et al. 2011)
<b>Enamelysin</b>	<b>Autosomal-rezessiv</b>	Exon 1	c.102G→A; p.W34X	Hypoplastisch/ hypomineralisiert (aus Urzua et al. 2011)
<b>(MMP20)</b>		Exon 5	c.678T→A; p.H226Q	Hypomaturiert (aus Urzua et al. 2011)

Gen	Erbgang	Gen- locus	Mutation (cDNA; Protein)	Phänotyp/Quelle
		Exon 6	c.910G→A; p.A304T	Hypomaturiert (aus Urzua et al. 2011)
		Intron 6	c.954-2A→T; p.I319X oder (?) p.I319fs338X	Hypomaturiert (aus Urzua et al. 2011)
<b>Kallikrein 4 (KLK4)</b>	<b>Autosomal- rezessiv</b>	Exon 4	c.458G→A; p.W153X	Hypomaturiert (aus Urzua et al. 2011)
<b>Distal less (DLX3)</b>	<b>Autosomal- dominant</b>	Exon 3	c.560_562delTC; p.Y188Q	Hypoplastisch- hy- pomaturiert mit Tau- rodontismus (aus Urzua et al. 2011)
<b>Family with sequence similarity 83, member H</b>	<b>Autosomal- dominant</b>	Exon 5	c.860C→A; p.S287X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
<b>(FAM83H)</b>		Exon 5	c. 891T→A; p.Y297X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.923_924delTC; p.L308fsX323	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.973C→T; R325X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1192C→T; Q398X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1243G→T; p.E415X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)

Gen	Erbgang	Gen- locus	Mutation (cDNA; Protein)	Phänotyp/Quelle
		Exon 5	c.1330C→T; p.Q444X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1354C→T; p.Q452X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1366C→T; p.Q456x	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1374C→A; p.Y458X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1379G→A; p.W/Q460X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1380G→A; p.W460X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1408C→T; p.Q470X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.1872_1873delCC; p.L625fsX703	Lokalisiert hypokalzi- fiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.2029C→T; p.Q677X	Generalisiert hypo- kalzifiziert (aus Urzua et al. 2011)
		Exon 5	c.2080G→T; p.E694X	Lokalisiert hypokalzi- fiziert (aus Urzua et al. 2011)
<b>WD Repeat- containing Protein 72</b>	<b>Autosomal- rezessiv</b>	Exon 12	c.1467_1468delAT; p.V491fsX497	Hypomaturiert (aus Lee et al. 2010)

Gen	Erbgang	Gen- locus	Mutation (cDNA; Protein)	Phänotyp/Quelle
<b>(WDR72)</b>		Exon 15	c.2348C→G; p.S783X	Hypomaturiert (aus El-Sayed et al. 2011)
		Exon 15	c.2728C→T; p.R897X	Hypomaturiert (aus El-Sayed et al. 2011)
		Exon 16	c.2857delA; p.S953VfsX20	Hypomaturiert (aus El-Sayed et al. 2011)
		Exon 17	c.2934G→A; p.W978X	Hypomaturiert (aus El-Sayed et al. 2011)



## Anamnesebogen zur Etablierung einer molekulargenetischen Diagnostik bei Amelogenesis imperfecta

Liebe Patientinnen, liebe Patienten, liebe Angehörige,

vielen Dank für Ihre Unterstützung!

Die Amelogenesis imperfecta ist eine genetisch bedingte Zahnschmelzbildungsstörung. Die Erkrankung beruht auf der Fehlfunktion verschiedener Proteine, u. a. Enamelin, Amelogenin, Kallikrein und Ameloblastin. Obwohl die Gene bekannt und auch bereits Krankheitsverursachende Mutationen in diesen Genen beschrieben sind, steht in Deutschland bislang keine molekulargenetische Diagnostik für die Amelogenesis imperfecta zur Verfügung. Ziel ist es also, im Rahmen einer zahnmedizinischen Doktorarbeit, ein diagnostisches Verfahren zum Nachweis der häufigsten Mutationen bei A. imperfecta zu entwickeln.

Die Amelogenesis imperfecta lässt sich in verschiedene Gruppen einteilen. Je nach Gruppe sind unterschiedliche Gene betroffen. Weiterhin folgt die Erkrankung verschiedenen Erbgängen, dabei sind die verschiedenen Gene unterschiedlich häufig betroffen. Daher ist es für uns wichtig, Informationen über die betroffenen Familienmitglieder und ihre Verwandtschaftsverhältnisse von Ihnen zu erhalten.

### Patientenangaben

Name:.....

Vorname:.....

Geburtsdatum:.....

Geschlecht: ☐ männlich ☐ weiblich

**Welche Form der Amelogenesis imperfecta wurde bei Ihnen diagnostiziert? (ggf. Befundkopien)**

.....

**Wer ist betroffen? (ggf. Stammbaum)**

.....

.....

.....

**Falls mehrere Familienmitglieder betroffen sind: Sind männliche Betroffene stärker erkrankt als weibliche?**

☐ ja ☐ nein

In jedem Falle erfolgt eine Kodierung Ihrer Probe, die für Außenstehende keinen Rückschluss auf Ihre Person zulässt (sog. Pseudonymisierung). Die Kodierung und Lagerung der Proben erfolgen im hiesigen Institut für Humangenetik.

Es ist eine Befristung der Nutzung sowohl der Probe als auch der daraus gewonnenen Daten auf 30 Jahre vorgesehen.

Eine Veröffentlichung der Forschungsergebnisse in Fachzeitschriften unter Verwendung vollständig anonymisierter Daten soll nach Abschluss aller Untersuchungen erfolgen. Die vollständige Anonymisierung gewährleistet, dass eine Zuordnung von Probe oder Daten zu einer bestimmten Person überhaupt nicht oder nur mit sehr großem Aufwand möglich ist. Es werden alle Richtlinien des Datenschutzes eingehalten.

Sollten sich bei diesen Untersuchungen allerdings sichere Erkenntnisse hinsichtlich einer Erkrankung oder Krankheitsdisposition für Sie bzw. Ihre Familie ergeben, haben Sie das Recht auf eine eingehende persönliche Beratung. Daher können Sie ausdrücklich angeben, ob Sie in einem solchen Falle eine Kontaktaufnahme von unserer Seite wünschen oder nicht.

<b>Einverständniserklärung</b> (Ist unbedingt erforderlich, nicht zutreffende Passagen können gestrichen werden.) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass von mir entnommenes Blut/Gewebe auf genetische Veränderungen bezogen auf obige Fragestellung untersucht wird. Hiermit erkläre ich weiterhin, dass ich über die Möglichkeiten und Grenzen der angeforderten Untersuchungen aufgeklärt worden bin. Die möglichen Ergebnisse der genetischen Untersuchungen wurden in ihren denkbaren Konsequenzen erörtert. Mir ist bekannt, dass ich eine humangenetische Beratung im Zusammenhang mit genetischer Diagnostik -auch vor deren Durchführung- in Anspruch nehmen kann. Mit der Aufbewahrung von Untersuchungsmaterial zum Zwecke der Nachprüfbarkeit der Ergebnisse und für eventuelle Zusatzuntersuchungen (auch wissenschaftlicher Art) bin ich einverstanden. Alle Angaben, die ich gemacht habe, sowie alle Ergebnisse der Untersuchung unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Sie werden nur mit meiner Zustimmung weitergegeben. Diese Einwilligungserklärung ist jederzeit widerrufbar.	
<b>Unterschrift Patient / Patientin / bzw. gesetzlicher Vertreter</b>   	<b>Unterschrift Arzt</b>   
Ort, Datum Patient / -in / gesetzl. Vertreter	Ort, Datum Arzt

## Institut für Humangenetik und Anthropologie

An die Patienten und ihre Angehörigen

Ansprechpartner  
Dr. J. Hentschel  
Tel.: 03641 9-35529  
Fax: 03641 9-35518  
E-Mail:  
julia.hentschel@mti.uni-jena.de

Jena, 05.08.2014

### Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung zur Etablierung einer molekulargenetischen Diagnostik bei erblich bedingten Zahnschmelz- Bildungsstörungen

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient, liebe Angehörige!

Zahnschmelzbildungsstörungen wie die Amelogenesis imperfecta können eine genetische Ursache haben. Diese Erkrankungen beruhen auf der Fehlfunktion verschiedener Proteine, u. a. Enamelin, Amelogenin, Kallikrein, Ameloblastin und Dentinogenin. Obwohl einige Gene bekannt und auch bereits Krankheitsverursachende Mutationen in diesen Genen beschrieben sind, steht in Deutschland bislang keine molekulargenetische Diagnostik für diese Zahnschmelzbildungsstörungen (z. B. Amelogenesis imperfecta, Dentinogenesis imperfecta) zur Verfügung. Ziel ist es also, ein diagnostisches Verfahren zum Nachweis der häufigsten Mutationen dieser Störungen der Zahnschmelzbildung zu entwickeln und nach weiteren unbekannten Genen zu forschen. Dafür benötigen wir Blut/ Mundschleimhautabstrich von gesunden Kontrollpersonen und Blut/Mundschleimhautabstrich von Betroffenen und ihren Familienangehörigen. Die daraus gewonnene DNA kann durch Se-

Leiter  
Prof. Dr. A.  
Baniahmad

Chefsekretariat  
Fr. A. Kirschner  
Tel.: 03641 9-35501  
Fax: 03641 9-35502

Besuchsadresse:  
Kollegiengasse 10  
07743 Jena

Postadresse:  
Postfach  
07740 Jena

Genetische Beratung  
OÄ Dr. med. I. Schreyer  
Tel.: 03641 9-35581  
Fax: 03641 9-35502

Zytogenetik  
Fr. Dr. A. Weise  
Tel.: 03641 9-35530  
Fax: 03641 9-35582  
Labor: 03641 9-35586

Molekulargenetik  
Prof. Dr. A. Baniahmad  
Tel.: 03641 9-35524  
Fax: 03641 9-34706  
Labor: 03641 9-35527

Molekulare Zytogenetik  
PD Dr. T. Liehr  
Tel.: 03641 9-35533  
Fax: 03641 9-35582  
Labor: 03641 9-35538

Tumorgenetik  
Fr. Dr. A. Heller  
Tel.: 03641 9-35534  
Fax: 03641 9-35518  
Labor: 03641 9-35512

Core-Unit Chipapplikation  
PD Dr. F. v. Eggeling  
Tel.: 03641 9-35526  
Fax: 03641 9-35518  
Labor: 03641 9-35528

Anthropologie  
Fr. PD Dr. K. Kromeyer-  
Hauschild  
Tel.: 03641 9-34617  
Fax: 03641 9-34618

quenzierung auf Mutationen in den verantwortlichen Genen untersucht werden und so eine klinische Diagnose molekulargenetisch gesichert werden.

☐ Ich stimme der Blutentnahme/Mundschleimhautabstrich sowie der genetischen Untersuchung der daraus gewonnenen DNA auf relevante Veränderungen in o.g. Genen zu.

☐ Ich stimme der Blutentnahme/Mundschleimhautabstrich sowie der genetischen Untersuchung der daraus gewonnenen DNA auf relevante Veränderungen in o.g. Genen **nicht** zu.

Anmerkungen zum Aufklärungsgespräch:

---

---

---

Ort, Datum

---

Unterschrift der Ärztin/des Arztes

**Einverständniserklärung****Patientendaten**

Name: \_\_\_\_\_

Geboren am: \_\_\_\_\_

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass von mir entnommenes Blut/Gewebe auf genetische Veränderungen bezogen auf obige Fragestellung untersucht wird. Hiermit erkläre ich weiterhin, dass ich über die Möglichkeiten und Grenzen der angeforderten Untersuchungen aufgeklärt worden bin. Die möglichen Ergebnisse der genetischen Untersuchungen wurden in ihren denkbaren Konsequenzen erörtert.

Mir ist bekannt, dass ich eine humangenetische Beratung im Zusammenhang mit genetischer Diagnostik - auch vor deren Durchführung - in Anspruch nehmen kann.

Mit der Aufbewahrung von Untersuchungsmaterial zum Zwecke der Nachprüfbarkeit der Ergebnisse und für eventuelle Zusatzuntersuchungen bin ich einverstanden.

Den Inhalt des Aufklärungsgesprächs habe ich verstanden.

Die Teilnahme an dem Etablierungsverfahren ist freiwillig. Ich kann jederzeit ohne Angabe von Gründen von meiner Zustimmung zurücktreten, ohne dass mir Nachteile entstehen.

Persönliche Daten werden anonymisiert, die Bestimmungen des Datenschutzes sowie die ärztliche Schweigepflicht werden von allen Beteiligten eingehalten.

Ich stimme zu, dass die anonymisierten Daten Eingang in eine Veröffentlichung erhalten.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Patientin/ des Patienten  
bzw. des gesetzlichen Vertreters

**Lebenslauf****Persönliche Daten**

Name, Vorname	Baum, Stefanie
Geburtsdatum, -ort	29.06.1979 in Saalfeld
Familienstand:	verheiratet
Kinder:	eine Tochter

**Schulausbildung**

1986 – 1990	Wilhelm-Pieck-Oberschule, Saalfeld
1990 – 1998	Heinrich-Böll-Gymnasium, Saalfeld
1998	Abitur

**Berufsausbildung**

1998 – 2001	Ausbildung zur Krankenschwester in der Thüringen-Klinik gGmbH „Georgius Agricola“, Saalfeld
2001	Examen

**Studium**

2001 – 2007	Studium der Zahnheilkunde an der Friedrich-Schiller- Universität, Jena
2007	Zahnmedizinisches Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin
2009 – 2013	Promovendin an der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität, Jena

**Beruflicher Werdegang**

2007 – 2009	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. P. Bracke in Gräfenroda
seit 2009	angestellte Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. C. Klingler in Bad Salzungen
seit 2013	Vertreterin in der Zahnarztpraxis B. Nordhaus in Schwarz- burg

Bad Blankenburg, 15.11.2013

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. R. Heinrich-Weltzien und Dr. J. Hentschel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bad Blankenburg, 15.11.2013